GENETISCHE UND BIOCHEMISCHE CHARAKTERISIERUNG DER ATP-SYNTHETASE VON E.COLI K 12

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors

der Naturwissenschaften

dem Fachbereich Biologie

der Eberhard - Karls - Universität zu Tübingen

vorgelegt von

PETER FRIEDL

aus Köln

1978

1979

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41523707_0033

GENETISCHE UND BIOCHEMISCHE CHARAKTERISIERUNG DER ATP-SYNTHETASE VON E.COLI K 12

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors

der Naturwissenschaften

dem Fachbereich Biologie

der Eberhard - Karls - Universität zu Tübingen

vorgelegt von

PETER FRIEDL

aus Köln

1979

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Tag der mündlichen Prüfung: 7. Dezember 1978

Dekan:	Prof. Dr. F. Oberwinkler
1. Berichterstatter:	Priv. Doz. Dr. H.U. Schairer
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. V. Braun

Herrn Schairer bin ich dankbar für die Themenstellung und die Betreuung während der Arbeit. Ihm sowie Herrn Overath, Herrn Vogel und Herrn Teather verdanke ich viele anregende Diskussionen während der Durchführung der Arbeit.

Der Max-Planck-Gesellschaft und der Gesellschaft für Biotechnologische Forschung mbH. danke ich für die Gewährung eines Stipendiums.

Inhaltsverzeichnis

		Seite
1.	EINLEITUNG	1
2.	ERGEBNISSE	8
2.1	Ausarbeitung eines Testsystems	8
2.1.1	Rekonstitution von Proteoliposomen nach Racker	12
2.1.2	Rekonstitution von Proteoliposomen durch ein einfaches Verfahren	14
2.1.3	Quantifizierung des Fluoreszenztestes	16
2.2	Versuche zur Reinigung des membranintegrierten Teiles (F_0) der ATP-Synthetase	18
2.2.1	Nachweis von F_0 in Extrakten ATPase-freier Membranvesikel	19
2.2.2	Extraktion ATPase-freier Membranvesikel mit verschiedenen Detergentien	20
2.2.3	Extraktion von F_0 mit Taurodesoxycholat: Optimierung der Extraktionsbedingungen	21
2.2.4	Stabilität von F_0 in Taurodesoxycholat-haltigen Puffern	22
2.2.5	Versuche zur Anreicherung von F_0	24
2.3	Versuche zur Reinigung der ATP-Synthetase (F_1F_0)	27
2.3.1	Methode nach Hare	27
2.3.2	Fraktionierung durch Ammoniumsulfat-Fällung	29
2.3.3	Auftrennung von Desoxycholat-Extrakten auf DEAE-Cellulose	30
2.3.4	Wirkung von Proteaseinhibitoren	33
2.3.5	Reinigung der ATP-Synthetase	33

2.4	Identifizierung der Untereinheiten	37
2.4.1	Konstruktion der Stämme	38
2.4.2	Charakterisierung der Mutante AM12	39
2.4.3	Vergleichende SDS-Gelelektrophorese der Membranproteine von Wildtyp und Mutante	39
2.4.4	Nachweis des DCCD-bindenden Proteins	41
2.5	Charakterisierung einer DCCD-resistenten Mutante	43
3.	DISKUSSION	47
	Zusammenfassung	58
4.	MATERIAL UND METHODEN	60
4.1	Abkürzungen	60
4.2	Bakterien- und Bakteriophagenstämme	62
4.3	Chemikalien und Enzyme	62
4.4	Puffer	63
4.5	Medien und Anzucht der Bakterienstämme	64
4.6	P1-Lysate und P1-Transduktionen	66
4.7	Mu-Lysate und Induktion von Mutationen durch Mu	67
4.8	Penicillin-Selektion	67
4.9	Proteinbestimmung	68
4.10	Bestimmung der Enzymaktivitäten	
4.10.1	Mg-ATPase	69
4.10.2	$NAD(P)^+$-Transhydrogenase	69
4.10.3	ATP-$^{32}P_i$-Austausch	69
4.10.4	Fluoreszenztest der Energieübertragung	70
4.10.5	Hemmung ATP-abhängiger Reaktionen mit DCCD	71
4.11	Membranisolierung	
4.11.1	Herstellung ATPase-freier Membranen	71
4.11.2	Membranen zur Extraktion der ATP-Synthetase mit Aminoxid bzw. Betain	72
4.11.3	Membranen zur Identifizierung der Untereinheiten der ATP-Synthetase	72

4.12	Anreicherung der ATPase	73
4.13	Extraktion von F_0 aus ATPase-freien Membranen	73
4.14	Extraktion der ATP-Synthetase aus Membranen	
4.14.1	Abgeändertes Verfahren nach Hare	74
4.14.2	Extraktion mit Taurodesoxycholat	74
4.14.3	Extraktion mit Aminoxid bzw. Betain	74
4.15	Rekonstitution von Proteoliposomen	
4.15.1	Rekonstitution durch Dialyse	74
4.15.2	Rekonstitution durch Gelfiltration	75
4.15.3	Rekonstitution durch Ultraschallbehandlung	75
4.15.4	Rekonstitution von Proteoliposomen durch ein einfaches Verfahren	75
4.16	Auftrennung des Extraktes ATPase-freier Membranen	
4.16.1	Stabilitätstest	76
4.16.2	Zentrifugation im Glyceringradienten	76
4.16.3	Gelfiltration auf Agarose O,5m	76
4.16.4	Chromatographie an Carboxymethyl-Cellulose	77
4.16.5	Adsorption an Hydroxylapatit	77
4.16.6	Chromatographie auf Phenyl-Sepharose	77
4.17	Ammoniumsulfat-Fällung	77
4.18	Fällung mit PEG 6000	77
4.19	DEAE-Chromatographie von Desoxycholat-Extrakten	78
4.20	DEAE-Chromatographie von Aminoxid-Extrakten	78
4.21	Ouchterlony-Doppeldiffusionstest	78
4.22	Gelelektrophorese	
4.22.1	Diskontinuierliche Elektrophorese im Poren=gradientengel	79
4.22.2	Kontinuierliche SDS-Gelelektrophorese	79
4.23	Fluorographie	80
4.24	Markierung des DCCD-bindenden Proteins mit (^{14}C)-DCCD und Extraktion des Proteins mit Chloroform/Methanol	80
4.25	Isolierung von Phosphatidyläthanolamin und Phosphatidylcholin	81

EINLEITUNG

ATP-Synthetasen katalysieren sowohl die Synthese von ATP aus ADP und P_i als auch umgekehrt die Hydrolyse von ATP. Sie kommen in den meisten Organismen vor. In höheren Zellen sind sie in der inneren Membran von Mitochondrien und Chloroplasten zu finden, bei Bakterien in der cytoplasmatischen Membran. An diesen Membranen laufen noch weitere Reaktionen ab : der aktive Transport von Ionen und Metaboliten, die Verschiebung des chemischen Gleichgewichtes durch die $NAD(P)^+$-Transhydrogenase, die Photoreaktion in Pflanzen und Photobakterien und die Oxidation von Substraten durch Enzyme der Atmungskette. Diese Reaktionen zeichnen sich durch folgende Eigenschaften aus (Harold, 1972) : sie sind mit einer Freisetzung oder einem Verbrauch von Energie verbunden, sie sind umkehrbar und sie sind miteinander gekoppelt. Das heißt, jede der energie= verbrauchenden Reaktionen kann von jeder der energiefreisetzenden Reaktionen getrieben werden. So kann die Energie für den aktiven Transport von ß-Galaktosiden sowohl von der Atmung als auch von der ATP-Synthetase katalysierten ATP-Hydrolyse zur Verfügung gestellt werden (Schairer & Haddock, 1972). Umgekehrt kann außer Atmung auch die in einem Konzentrationsgradienten enthaltene Energie die Synthese von ATP treiben (Jagendorf & Uribe, 1966; Maloney et al., 1974). Alle diese Reaktionen sind über einen energiereichen Zustand -„~"- der Membran gekoppelt. Entkoppler zerstören den energiereichen Zustand der Membran und damit die Energieübertragung zwischen den einzelnen Reaktionen (Abb.1).

Abb.1 Kopplung energieübertragender Reaktionen (aus Harold)

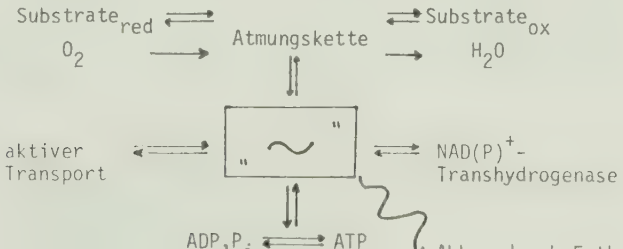
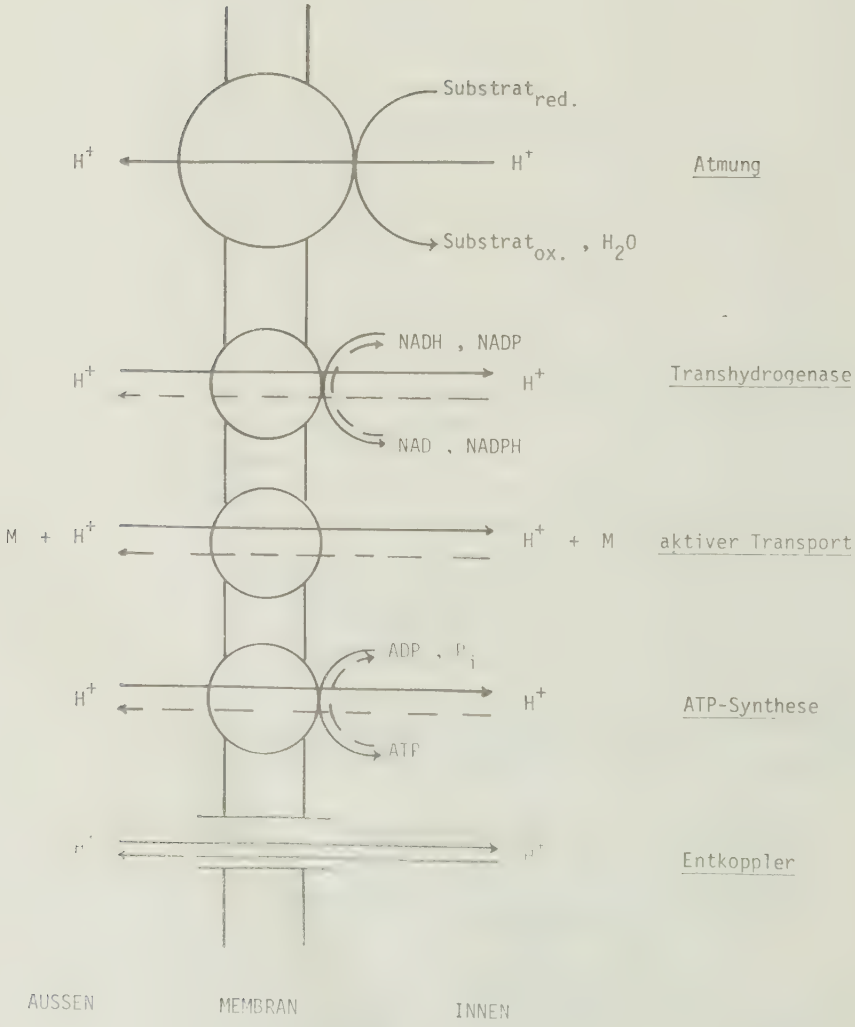


Abb.2 Energieübertragung nach dem chemiosmotischen Modell



Zur Natur und Entstehung des energiereichen Zustandes wurden verschiedene Modelle entwickelt. Die Hypothese der chemischen Kopplung (Slater) postuliert, daß bei der Oxidation in der Atmungskette ein energiereicher Zwischenträger, "X~Y", entsteht, der zur Bildung von "ADP~X" führt, das mit P_i zu ATP umgesetzt wird. Weder "X~Y" noch "ADP~X" wurden je nachgewiesen.

In der von Mitchell formulierten Hypothese der chemiosmotischen Kopplung (Mitchell, 1967) bewirkt ein über der Membran liegender Protonengradient und/oder eine Potentialdifferenz den energiereichen Zustand der Membran. Die Potentialdifferenz ($\Delta\psi$) und/oder der Protonengradient (Δ pH) üben auf Protonen eine Kraft aus - "proton-motive-force" (pmf)-

$$pmf = \Delta\psi - Z \cdot \Delta pH \qquad (s.\ x)$$

Jede am energiereichen Zustand der Membran beteiligte Reaktion führt in ihrem Ablauf zu einer Protonen- und/oder Ladungsbewegung über die Membran. Eine energiefreisetzende Reaktion vergrößert die pmf, eine energieverbrauchende Reaktion baut sie wieder ab. Entkoppler zerstören den energiereichen Zustand der Membran durch Erhöhung der Protonenleitfähigkeit. Die Kopplung verschiedener Reaktionen durch die pmf ist in Abbildung 2 schematisch dargestellt. Wie die Protonen- und Ladungsbewegungen mit den enzymatischen Reaktionen gekoppelt sind, konnte bisher nicht geklärt werden. Die Reinigung und Charakterisierung der beteiligten Enzyme kann dazu einen Beitrag leisten.

Der oxidative Energiestoffwechsel wurde zunächst intensiv an den Mitochondrien höherer Zellen untersucht. In den letzten Jahren verstärkte sich das Interesse am Energiestoffwechsel von E.coli. E.coli ist der Organismus, dessen genetisches System am besten untersucht ist und der am leichtesten genetisch manipuliert

x pmf in elektrischen Einheiten, Umrechnungsfaktor $Z = 2{,}3 \cdot R \cdot T \cdot (F)^{-1}$

werden kann. E.coli ist daher für eine gezielte Kombination genetischer und biochemischer Verfahren besonders geeignet. Zudem zeigen die ATP-Synthetasen verschiedener Organismen eine große Ähnlichkeit in Aufbau und katalytischen Eigenschaften (Abrams & Smith, 1974; Penefsky, 1974; Sebald, 1977). Die ATPase-Aktivität kann einem Teil des Enzyms, F_1, zugeordnet werden. F_1 ist an einen in die Membran integrierten Teil, F_0, gebunden (s. x). F_1 besitzt ein Molekulargewicht von 300000 bis 400000 und besteht aus fünf verschiedenen Polypeptidketten mit Molekulargewichten von 10000 bis 60000. Die meisten ATPase--Hemmstoffe binden an F_1; nur N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid (DCCD), Oligomycin und Venturicidin binden an F_0. Der membranintegrierte Teil der E.coli ATP-Synthetase bindet nur DCCD.
F_1 kann bei E.coli durch Puffer niederer Ionenstärke von der Membran abgelöst werden (Bragg & Hou, 1972). Es ist ein wasser=lösliches Protein mit einem Molekulargewicht von ca. 340000 (Vogel & Steinhart, 1976). Es besteht aus fünf verschiedenen Polypeptidketten mit den Molekulargewichten α 56000, β 52000, γ 32000, δ 21000 und ε 11500. F_1 läßt sich auf verschiedene Weise in Untereinheiten zerlegen. Die Zusammensetzung der isolierten Spaltprodukte und ihre Reassoziation zu F_1 lassen auf einen $(\alpha\ \beta\ \gamma)_2(\delta\ \varepsilon)_{1-2}$ Aufbau für F_1 schließen (Vogel & Steinhart, 1976). Die Eigenschaften teilweise rekonstituierter Komplexe geben Hinweise auf die Funktion der einzelnen Untereinheiten. Ein tryptisches Abbauprodukt ($\alpha\ \beta$) zeigt noch ATPase-Aktivität (Nelson et al., 1974). Zur Rekonstitution der ATPase-Aktivität aus den isolierten Untereinheiten α und β ist γ unerläßlich (Futai, 1977; Larson & Smith, 1977). Ein ($\alpha\ \beta\ \gamma\ \varepsilon$)-Komplex benötigt zur Bindung an die Membran δ, ein ($\alpha\ \beta\ \gamma\ \delta$)-Komplex ε (Smith & Sternweis, 1975 u. 1977; Sternweis & Smith, 1977; Sternweis, 1978). Ein ATPase-aktiver ($\alpha\ \beta$)-Komplex bindet weder δ noch ε (Larson & Smith, 1977). Danach könnte den einzelnen Untereinheiten folgende Funktion zugeordnet werden : α und β sind notwendig für die ATPase-Aktivität, γ für den richtigen

x da im weiteren Verlauf der Arbeit nur von der E.coli ATP-Synthetase die Rede ist, wird auf die unterscheidenden Bezeichnungen BF und CF (B=bakteriell, C=Chloroplasten) verzichtet

Zusammenbau des Komplexes, δ und ε für die Bindung an die Membran. Ob ε zusätzlich eine regulatorische ATPase-hemmende Funktion ausübt, erscheint fraglich : die durch ε ermöglichte Bindung des (α ß γ δ)-Komplexes an die Membran zeigt eine Stöchiometrie von 1:1 (Sternweis, 1978); eine maximale Hemmung der ATPase-Aktivität tritt erst bei ca. 200fachem molaren Überschuß an ε auf (Nieuwenhuis & Bakkenist, 1977; Smith & Sternweis, 1977).

Die Ablösung von F_1 führt zu einer teilweisen Entkopplung energieübertragender Reaktionen (Nieuwenhuis et al., 1973; Schairer et al., 1976). Das ist auf die erhöhte Protonenleitfähigkeit ATPase-freier Membranen zurückzuführen (Altendorf et al., 1974; Rosen, 1973). Die erhöhte Protonenleitfähigkeit wird von dem in der Membran verbliebenen F_0 hervorgerufen. Erneute Bindung von F_1 oder Bindung von DCCD an F_0 senkt die Protonendurchlässigkeit und stellt die Kopplung energieübertragender Reaktionen wieder her (vgl. aber Boonstra et al., 1975; Rosen et al., 1978). Die zur ATP-Synthese notwendige Energie wird von der pmf durch einen Protonenfluß auf die ATP-Synthetase übertragen. Die protonen= leitende Eigenschaft von F_0 spricht dafür, daß der Protonenfluß von F_0 auf F_1 geleitet wird. Der molekulare Mechanismus der Protonenleitung von F_0 und die Struktur von F_0 sind unbekannt. Das DCCD-bindende Protein konnte identifiziert und gereinigt werden (Altendorf & Zitzmann, 1975; Fillingame, 1975). Es ist ein wasserunlösliches Protein vom Molekulargewicht 8500 und bekannter Aminosäuresequenz; DCCD bindet an einen Asparaginsäurerest in Position 61 der Aminosäuresequenz (Sebald, 1978). Das Protein kann in Phospholipidvesikel integriert werden (Criddle et al., 1977). Es gelang nicht, mit den Proteoliposomen eine protonen= leitende Eigenschaft des isolierten Proteins nachzuweisen (vgl. aber Altendorf, 1977; Nelson et al., 1977).

F_1 katalysiert die ATP-Hydrolyse; eine Energieübertragung ist aber nur möglich, wenn F_1 an F_0 gebunden und der F_1F_0-Komplex in die Membran eines geschlossenen Vesikels eingebaut ist (s.x) Über die Wechselwirkung zwischen F_1 und F_0 sowie den Aufbau von F_0 ist bisher wenig bekannt. Die Reinigung einer aktiven ATP-Synthetase und ihre Rekonstitution zu Proteoliposomen ermöglicht die nähere Charakterisierung des Enzyms. Die Enzyme von Wildtyp und ATP-Synthetase defekten Stämme können miteinander verglichen werden und weitere Informationen liefern über wesentliche Strukturen des Komplexes und ihre Funktionen.

F_0 ist ein wasserunlöslicher Komplex. Die ATP-Synthetase kann daher nur durch Detergenz aus der Membran extrahiert und in Lösung gehalten werden. Detergentien, Phospholipide und Membran=proteine bilden zusammen in Wasser größere Aggregate (Micellen). Bei ungeladenen Detergentien ist die Zahl der Detergenzmoleküle pro Micelle (Aggregationszahl) meist sehr hoch (Kagawa, 1972) und gleicht die Größe der verschiedenen Protein/Detergenz/Lipid--Micellen damit an. Eine Auftrennung der Proteine nach ihrer Größe z.B. durch Gelfiltration wird dadurch beeinträchtigt. Die Ladungsunterschiede der einzelnen Proteine werden bei Bindung von geladenen Detergentien verwischt. Eine Trennung der Proteine auf Grund von Ladungsunterschieden z.B. durch Ionenaustauscherchroma=tographie wird dadurch erschwert. Eine Auftrennung der Proteine wird noch schwieriger, wenn die Micelle mehr als ein Protein enthält oder wenn zwischen den verschiedenen Micellen starke Wechselwirkungen auftreten. Bei einer Spaltung der Protein- bzw. Micellaggregate besteht die Gefahr einer Dissoziation von Enzym=komplexen oder gar der Denaturierung von Proteinen.

Nach jedem Reinigungsschritt sollte die Aktivität des Enzyms

x ausgenommen in-vitro Systeme, bei denen Enzyme in eine Membran eingebaut werden, die zwei Räume voneinander trennt (Black--Film Systeme)

getestet werden. Dazu muß die ATP-Synthetase in die Membran eines Phospholipidvesikels eingebaut werden. Die Anwesenheit von Detergenz bereitet dabei Schwierigkeiten. Einerseits kommt es ohne Detergenz zu keinem quantitativen Einbau des Enzyms. Andererseits sind Phospholipidvesikel und in noch viel stärkerem Maße energieübertragende Reaktionen gegen Detergentien sehr empfindlich (Kagawa, 1972).

In der vorliegenden Arbeit wurde die ATP-Synthetase von E.coli weitgehend gereinigt. Das Enzym wurde in Phospholipidvesikel eingebaut und eine ATP-abhängige Energieübertragung rekonstituiert. Die Charakterisierung verschiedener Mutanten mit veränderter ATP-Synthetase führte zu einer eindeutigen Identifizierung der Untereinheiten des Enzymkomplexes.

ERGEBNISSE

1. Ausarbeitung eines Testsystems

Zur Anreicherung der ATP-Synthetase ist ein enzymatischer Test erforderlich. Der Nachweis einer ATP-Synthese benötigt einen zeitlich größeren Aufwand und ist mit einigen experimentellen Schwierigkeiten verbunden. Das Enzym muß in die Lipiddoppel= schicht eines geschlossenen Vesikels integriert sein und mit einer die ATP-Synthese treibenden Energiequelle gekoppelt werden (Kagawa, 1972).

Die ATPase-Aktivität einer Präparation kann sowohl auf einen F_1F_0-Komplex als auch auf F_1 zurückzuführen sein. Mit Hilfe von ATPase-Hemmstoffen, die an F_0 binden, wird versucht zwischen diesen Möglichkeiten zu unterscheiden. Bei E.coli bindet F_0 nur den ATPase-Inhibitor DCCD. Die DCCD-Hemmbarkeit der ATPase--Aktivität ist aber nur ein Indiz dafür, ob eine Enzympräparation eine ATP-Synthese katalysieren kann. Es gibt Bedingungen, unter denen die ATPase-Aktivität von F_1 ebenfalls DCCD-hemmbar ist. Ein Beispiel ist in Abbildung 3 dargestellt: mit abnehmendem pH nimmt die DCCD-Hemmbarkeit von F_1 zu. Auch gibt es Enzym= präparationen, deren ATPase-Aktivität DCCD-hemmbar ist, die aber keine ATP-Synthese mehr katalysieren (Schneider,persönliche Mitteilung).

Ein weiterer enzymatischer Test besteht darin,die energieüber= tragende Aktivität der ATP-Synthetase nachzuweisen. Der Unterschied zwischen einer nicht energieübertragenden und einer energieübertragenden ATPase-Aktivität ist in Abbildung 4 schematisch dargestellt. Bei einer durch F_1 katalysierten ATP-Hydrolyse geht Energie als Wärme verloren. Bei der durch einen membrangebundenen F_1F_0-Komplex katalysierten Reaktion wird die Energie zum Aufbau einer pmf verwandt. Dadurch wird die

Abb.3 DCCD-Hemmbarkeit der ATPase-Aktivität in Abhängigkeit vom pH

Membranvesikel (o) und F_1 (•) werden bei angegebenem pH mit 50µM DCCD inkubiert, die Proteinkonzentr. beträgt 1mg/ml. Die verbleibende ATPase-Aktivität ist als % der Ausgangsaktivität angegeben.

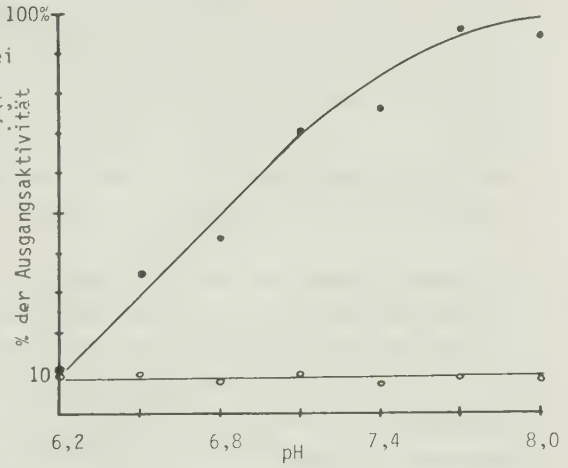
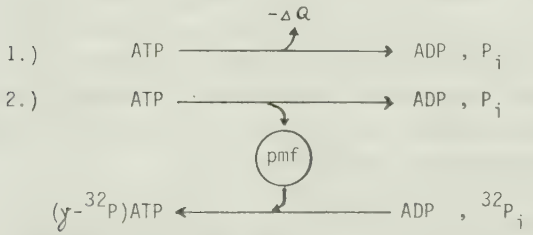


Abb.4 Schematische Darstellung des ATP-$^{32}P_i$-Austausches



Die erste Reaktion stellt eine von F_1 katalysierte, nicht energieübertragende ATP-Hydrolyse dar.
Die zweite Reaktion stellt eine von einer membrangebundenen ATP-Synthetase katalysierte ATP-Hydrolyse dar.

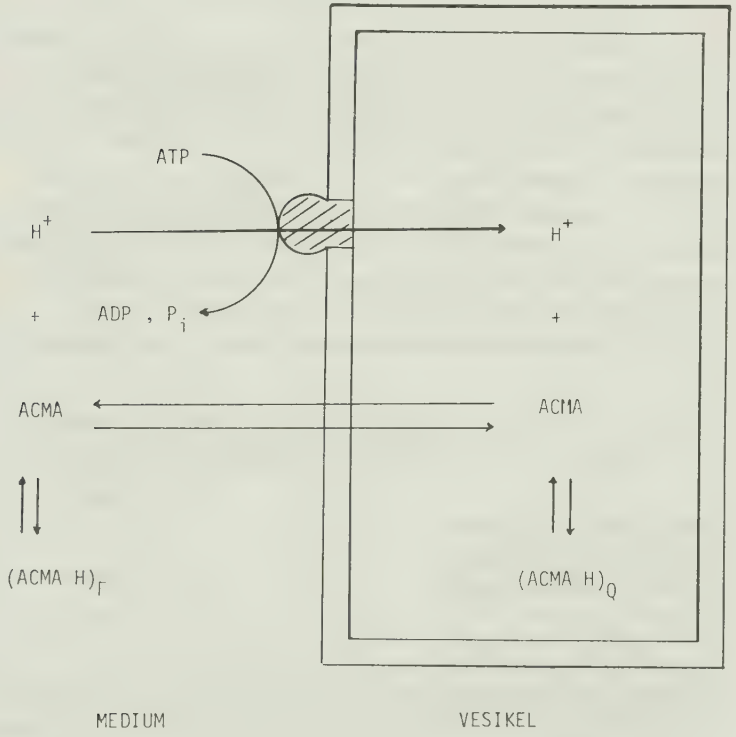
Reaktion reversibel : die gespeicherte Energie kann die ATP-Synthese treiben. Die Rückreaktion wird nachgewiesen, indem man die ATP-Hydrolyse in Gegenwart von $^{32}P_i$ ablaufen läßt und die Bildung von (γ -^{32}P)ATP verfolgt. Die im ATP-$^{32}P_i$-Austausch gemessene ATP-Synthese Aktivität liegt in dergleichen Größenordnung wie die der oxidativen Phosphorylierung (Butlin et al., 1971; Schairer et al., 1976).

Ein anderer Nachweis der pmf beruht auf der Fluoreszenzänderung von Indikatorfarbstoffen. Die Fluoreszenz von 9-Amino-6-chlor--2-methoxyacridin (ACMA) wird beim Aufbau einer pmf (H^+_{innen} > $H^+_{außen}$) gelöscht. Die Energieabhängigkeit der Fluoreszenz=löschung beruht wahrscheinlich auf einer pH-Differenz zwischen Vesikelinnerem und Medium (Schuldiner et al., 1971). Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, daß durch den energiereichen Zustand der Membran eine elektrostatische Bindung des Farbstoffs an die Membran hervorgerufen wird (Dell'Antone et al., 1972). Das in Abbildung 5 vorgeschlagene Modell setzt voraus, daß die Membran für ACMA durchlässig und für die protonierte Form des Farbstoffes undurchlässig ist. Bei einer Ansäuerung des Vesikelinneren verschiebt sich dort das Gleichgewicht zu Gunsten der protonierten Form. Die dadurch auftretende Konzentrations=differenz der nicht protonierten Form ($ACMA_{innen}$ > $ACMA_{außen}$) wird durch nachfließendes ACMA ausgeglichen. Die Konzentrierung von ACMA im Vesikelinneren führt dann zu der Fluoreszenzlöschung z.B. durch Stapelung des Farbstoffs.

Der Fluoreszenztest und der ATP-$^{32}P_i$-Austausch sind ein gutes Maß für die Aktivität der ATP-Synthetase bei der oxidativen Phosphorylierung (Schairer et al., 1976). Bei der oxidativen Phosphorylierung muß die ATP-Synthese von einer unabhängigen Energiequelle getrieben werden. Bei den beiden anderen Tests entfällt die Notwendigkeit einer von der ATP-Synthetase unab=hängigen Energiequelle. Allerdings muß das Enzym auch hierzu in ein geschlossenes Vesikel eingebaut werden.

Abb.5 Modell zur energieabhängigen Fluoreszenzlöschung von ACMA

$(ACMA\ H)_F$ = protoniertes ACMA mit normaler Fluoreszenz
$(ACMA\ H)_Q$ = protoniertes ACMA mit gelöschter Fluoreszenz



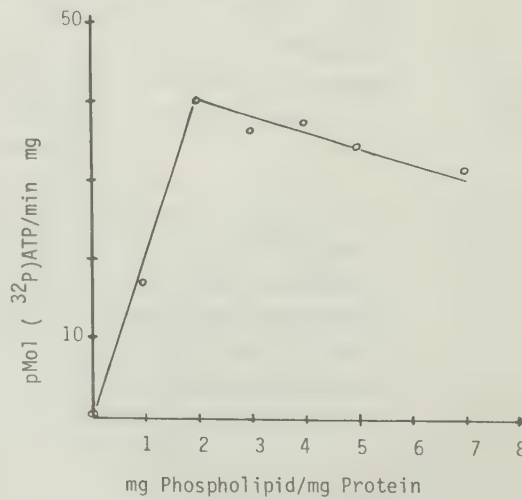
1.1 Rekonstitution von Proteoliposomen nach Racker

Racker und Mitarbeiter arbeiteten verschiedene Methoden aus, Enzyme in die Membran von Phospholipidvesikeln einzubauen : Rekonstitution durch Dialyse (Kagawa & Racker, 1971), Rekonstitution durch Gelfiltration (Kagawa et al., 1973), und Rekonstitution durch Ultraschallbehandlung (Racker & Eytan, 1973). Zunächst wurde versucht, diese mit Enzymen von Rinderherz Mitochondrien ausgearbeiteten Verfahren auf die E.coli ATP-Synthetase zu übertragen.

Bei der Rekonstitution durch Dialyse (4.15.1.) wird eine Phospholipid/Detergenz Suspension mit der ATP-Synthetase Präparation gemischt und das Detergenz möglichst weitgehend entfernt. Bei der Wahl geeigneter Dialysebedingungen bilden sich unilamellare Liposomen, in deren Membran das Enzym eingebaut wurde (Kagawa, 1972). Die Geschwindigkeit der Dialyse hängt von der kritischen micellaren Konzentration des Detergenz ab, da nur das Detergenzmonomer aus dem Dialyseschlauch austreten kann. In Abbildung 5 ist dargestellt, wie die ATP-$^{32}P_i$-Austausch Aktivität der Proteoliposomen vom Verhältnis Phospholipid zu Protein abhängt.

Abb.5 ATP-$^{32}P_i$-Austausch rekonstituierter Proteoliposomen in Abhängigkeit vom Verhältnis Phospholipid zu Protein

DOC-Extrakte von Membranvesikeln werden mit Phospholipid durch Dialyse zu Proteoliposomen rekonstituiert und die ATP-$^{32}P_i$-Austausch Aktivität bestimmt (Ordinate). Abszisse: Gewichtsverhältnis von Phospholipid zu Protein bei der Dialyse



Maximale Aktivität wird bei einem Verhältnis Phospholipd zu Protein > 2 erreicht. Die spezifische Aktivität dieser Proteoliposomen liegt wesentlich unter der von Membranvesikeln (Tab.1). Dies kann darauf beruhen, daß unter den Dialysebedingungen 80-90% der ATPase-Aktivität verloren geht.

Tab.1 Vergleich verschiedener Rekonstitutionsmethoden

Membranvesikel werden mit DOC extrahiert (4.14.1) und auf die angegebene Weise (4.15) mit Phospholipid zu Proteoliposomen rekonstituiert. ATP-abhängige Energieübertragung wird als ATP-$32P_i$-Austausch gemessen (4.10.3)

Rekonstitution der Proteoliposomen durch	$\frac{ATP\text{-}^{32}P_i\text{-Austausch}}{nMol(\gamma\text{-}^{32}P)ATP / min \times mg}$	
	-	+ 50µM CCCP
Dialyse	0,1	< 0,05
Gelfiltration	0,5	0,1
Ultraschall	0,4	0,1
Phospholipid-zugabe	2,2	0,1
Membranvesikel	2,5	< 0,05

Bei der Rekonstitution durch Gelfiltration (4.15.2) wird das Detergenz durch Filtration über eine Sephadex G-100 Säule aus dem Rekonstitutionsansatz entfernt. Das Detergenz läßt sich nur abtrennen, wenn die Größe der Detergenzmicelle sich deutlich von der Größe der Detergenz/Protein/Lipid-Micelle unterscheidet. Die während der Gelfiltration gebildeten Proteoliposomen eluieren im Leervolumen der Säule. Tabelle 1 zeigt, daß ihre spezifische

ATP-$^{32}P_i$-Austausch Aktivität unter der von Membranvesikeln liegt.

Bei der Rekonstitution durch Ultraschallbehandlung (4.15.3) wird ein Gemisch aus Phospholipid und ATP-Synthetase Präparation beschallt. Die spezifische ATP-$^{32}P_i$-Austausch Aktivität der entstandenen Proteoliposomen ist vergleichbar der Aktivität durch Gelfiltration rekonstituierter Vesikel (Tab.1). Längere Beschalldauer oder Erhöhung der vom Gerät abgegebenen Ultra= schalleistung führen zu einer Abnahme der spezifischen Aktivität.

1.2 Rekonstitution von Proteoliposomen durch ein einfaches Verfahren

Die bisher geschilderten Verfahren zur Rekonstitution von Proteoliposomen zeigen unbefriedigende Ergebnisse. Die Rekonsti= tution durch Dialyse bzw. Gelfiltration ist zeitraubend und erfordert größere Mengen an Phospholipid und Enzym; bei der Rekonstitution durch Ultraschallbehandlung ist die richtige Wahl von Beschalldauer und -intensität kritisch. Die energie= übertragende Aktivität der Proteoliposomen liegt weit unter der von Membranvesikeln. Daher wurde eine neue Methode zur Rekonstitution energieübertragender Proteoliposomen ausgearbeitet.

Phospholipid wird durch eine intensive Ultraschallbehandlung suspendiert (s. x) und zu einem Ansatz gegeben, der eine definierte Menge an Protein, Detergenz und Salz enthält (4.15.4). Nach einer Inkubation von 10min erhält man Proteoliposomen, deren ATP-$^{32}P_i$-Austausch Aktivität der von Membranvesikeln vergleichbar ist (Tab.1). Der ATP-$^{32}P_i$-Austausch ist abhängig von Phospholipid und wird durch 50µM des Entkopplers CCCP unterdrückt (Tab.2). Das weist darauf hin, daß die gemessene Aktivität Folge einer membranabhängigen Energieübertragung ist (Kagawa, 1972; Harold, 1972). Die DCCD-Hemmbarkeit des Austausches zeigt, daß diese Reaktion von der ATP-Synthetase katalysiert wird.

x unter den angegebenen Bedingungen bilden die Phospholipide größtenteils unilamellare Vesikel (Thilo, persönliche Mitteilung)

Tab.2 ATP-abhängige Energieübertragung in Proteoliposomen

Ein DOC-Extrakt von Membranvesikeln wird mit Phospholipid zu Proteoliposomen rekonstituiert (4.15.4) und die ATP-abhängige Energieübertragung im Fluoreszenztest (4.10.4) und im ATP-32P--Austausch bestimmt(4.10.3); Hemmung mit DCCD siehe (4.10.5).

	ATP-$^{32}P_i$-Austausch nMol(γ-^{32}P)ATP/min x mg	Aktivität im Fluoreszenztest
Membranvesikel	2,5	+
+50µM CCCP	< 0,05	-
+50µM DCCD	0,1	-
Proteoliposomen	2,2	+
+50µM CCCP	0,1	-
+50µM DCCD	0,2	-
keine Phospho= lipidzugabe zum Rekonstitutions= ansatz	0,3	-

Im Fluoreszenztest wird mit TTFB entkoppelt, da CCCP durch Absorption im Bereich der benutzten Wellenlängen stört.

Die Rekonstitutionsmethode hat gegenüber den vorher geschilderten drei entscheidende Vorteile: die Proteoliposomen zeigen eine erheblich höhere ATP-$^{32}P_i$-Austausch Aktivität, das Verfahren ist einfach und schnell auszuführen, die Rekonstitution kann in Gegenwart verschiedenster Detergentien ausgeführt werden (vgl. 2.2.2 u. 2.3.5).

1.3 Quantifizierung des Fluoreszenztestes

Der ATP-$^{32}P_i$-Austausch ist ein quantitatives Maß für die energie= übertragende Aktivität der ATP-Synthetase (Schairer et al., 1976). Verglichen mit einem optischen Test ist er mit größerem experimen= tellem und zeitlichem Aufwand verbunden. Der Fluoreszenztest ist schnell und einfach auszuführen. Er kann quantitativ ausge= wertet werden, indem die Anfangsgeschwindigkeit der Fluoreszenz= löschung von ACMA bestimmt wird (4.10.4). Die Anfangs= geschwindigkeit ist der Menge an eingesetztem Protein proportional (Abb.7). Die folgenden Versuche zeigen, daß die so erhaltene spezifische Aktivität - E_{Fl}/mg Protein - ebenso ein quantitatives Maß für die energieübertragende Aktivität der ATP-Synthetase ist wie die im ATP-$^{32}P_i$-Austausch gemessene Aktivität.

Abb.7 Anfangsgeschwindigkeit der Fluoreszenzlöschung von ACMA in Abhängigkeit von der Menge eingesetzten Proteins

Ein DOC-Extrakt von Membranvesikeln wird zu Proteoliposomen rekonsti= tuiert und die Anfangs= geschwindugkeit der Fluoreszenzlöschung von ACMA bestimmt (4.10.4)

Ordinate: Aktivität im Fluoreszenztest
Abszisse: Menge des im Test eingesetzten Proteins

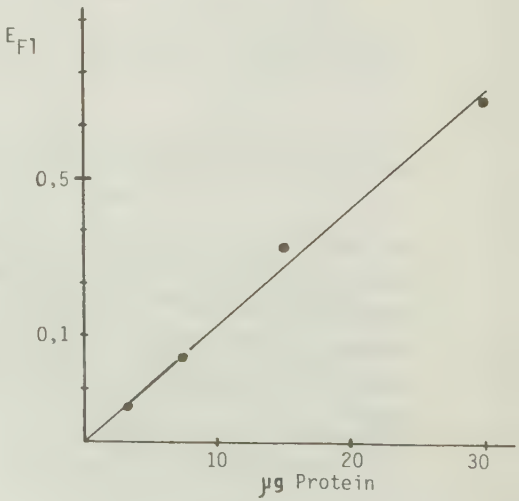


Abb. 8 Rekonstitution der ATP-abhängigen Energieübertragung in ATPase-freien Membranvesikeln

Jeweils 100µg ATPase-freie Membranvesikel werden mit steigenden Mengen F_1 bei Raumtemperatur inkubiert; nach 10min wird die ATP-abhängige Energieübertragung gemessen (Ordinate). Abszisse: Verhältnis von F_1 (in E ATPase -Akt.) zu Membranprotein

A

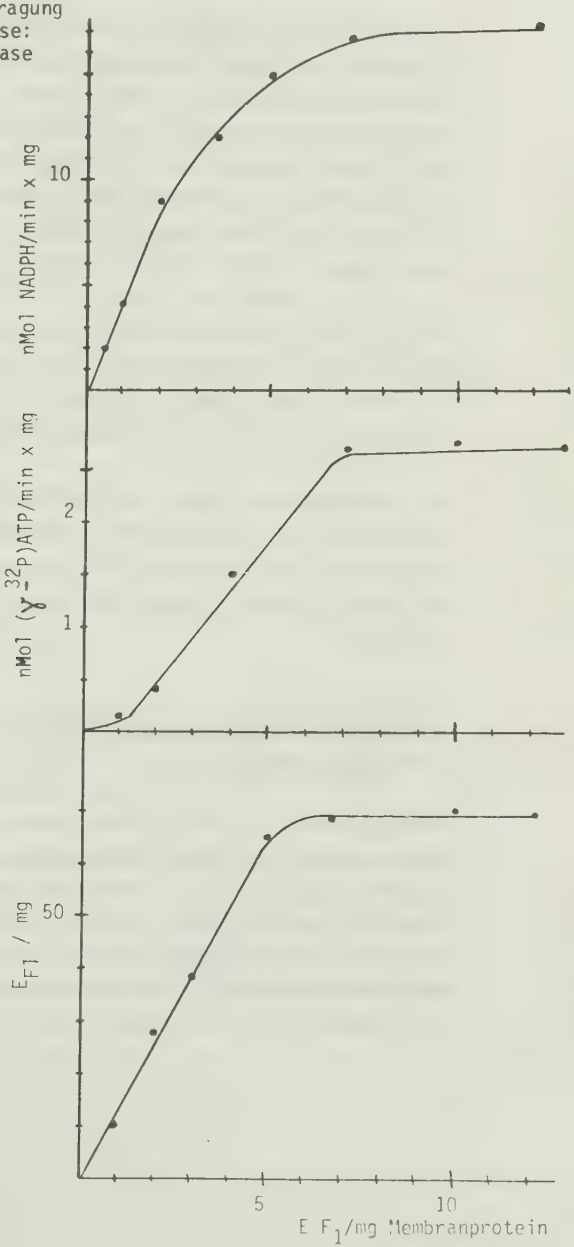
ATP-abhängige Trans= hydrogenase-Aktivität

B

ATP-$^{32}P_i$-Austausch Aktivität

C

Anfangsgeschwindigkeit der Fluoreszenzlöschung von ACMA



ATPase-freie Membranvesikel werden mit den angegebenen Mengen F_1 gemischt und die ATP-abhängige Energieübertragung auf verschiedene Weise gemessen. Abbildung 8 A zeigt die ATP-abhängige Transhydrogenase Aktivität, Abb. 8 B den ATP-$^{32}P_i$-Austausch und Abb. 8 C den Fluoreszenztest in Abhängigkeit von zugegebenem F_1. Die Rekonstitution der Energieübertragung verläuft in allen drei Fällen gleich: halbmaximale Aktivität bei 2,7 bzw. 3,3 E F_1/mg-Membranprotein, maximale Aktivität bei 7 E F_1/mg-Membranprotein.

Das stimmt mit Versuchen von Singh und Bragg (1977) überein. Sie zeigten, daß die Anfangsgeschwindigkeit der Fluoreszenzlöschung von Atebrin direkt proportional verläuft zur protonenpumpenden ATPase-Aktivität von E.coli Membranvesikeln.

Der Fluoreszenztest besitzt die Empfindlichkeit des ATP-$^{32}P_i$-Austausches, ist aber wesentlich einfacher und schneller auszuführen. Zum Nachweis der ATP-abhängigen Energieübertragunng wird daher im weiteren Verlauf der Arbeit meistens der Fluoreszenztest benutzt.

2. Versuche zur Reinigung des membranintegrierten Teiles (F_0) der ATP-Synthetase

Manches spricht für eine getrennte Reinigung von F_1 und F_0 der ATP-Synthetase. Die E.coli ATP-Synthetase zerfällt leicht in F_1 und F_0, was bei einer Anreicherung des F_1F_0-Komplexes zu einem Problem wird (siehe 2.3.3). F_1 läßt sich mit Puffern niederer Ionenstärke von der Membran ablösen und reinigen. Beim Waschen der Membranvesikel werden ca. 60% des Proteins entfernt, was zu einer Anreicherung des verbleibenden F_0 führt.

2.1 Nachweis von F_0 in Extrakten ATPase-freier Membranvesikel

ATPase-freie Membranvesikel werden mit Taurodesoxycholat (TDOC) extrahiert und der Extrakt mit Phospholipid und F_1 zu Proteoliposomen rekonstituiert. Die ATP-abhängige Energieübertragung wird durch die Anfangsgeschwindugkeit der Fluoreszenzlöschung von ACMA gemessen. Die Fluoreszenzlöschung ist von F_1 und Phospholipid abhängig und wird durch 20µM des Entkopplers TTFB unterdrückt (Tab.5). Die Abhängigkeit von F_1 und Phospholipid sowie die Entkoppelbarkeit durch TTFB zeigen, daß eine von der ATP-Synthetase katalysierte Energieübertragung gemessen wird. Die Reihenfolge der Zugabe von F_1 und Phospholipid ist für die Rekonstitution unwesentlich (vgl. Tab.5 Spalte 3 u.4). Abb.9 verdeutlicht die strikte Abhängigkeit der Energieübertragung von F_1. Bei den folgenden Versuchen (2.2.2 bis 2.2.5) wird dem Rekonstitutionsansatz stets ein Überschuß an F_1 zugegeben. Nur dann ist sichergestellt, daß die gemessene Aktivität ein Maß für den Gehalt an F_0 bzw. den Zustand von F_0 in einer Proteinfraktion darstellt.

Tab.5 Rekonstitution von Proteoliposomen mit Extrakten ATPase-freier Membranvesikel

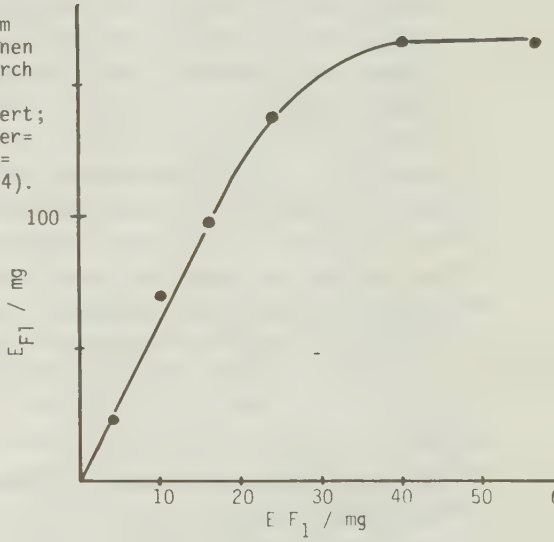
TDOC-Extrakte ATPase-freier Membranvesikel werden mit F_1 und Phospholipid zu Proteoliposomen rekonstituiert. Die ATP-abhängige Energieübertragung wird im Fluoreszenztest gemessen. Das Verhältnis F_1 zu Membranprotein beträgt 0,1 E ATPase / µg Membranprotein.

Zusatz zum Rekonstitutionsansatz	Aktivität im Fluoreszenztest E_{F1} / mg
-	< 0,1
+ Phospholipid	0,3
zuerst +Phospholipid, dann + F_1	33
zuerst + F_1, dann + Phospholipid	35
+ F_1, + Phospholipid + TTFB	< 0,1

Abb.9 Abhängigkeit der ATP-getriebenen Energieübertragung vom F_1 Gehalt der rekonstituierten Proteoliposomen

Zu jeweils 20µg extrahiertem Protein werden die angegebenen Mengen an F_1 gegeben und durch Zugabe von Phospholipid Proteoliposomen rekonstituiert; die ATP-abhängige Energieübertragung wird im Fluoreszenztest bestimmt(4.15.4, 4.10.4).

Ordinate: Aktivität im Fluoreszenztest
Abszisse: Verhältnis von F_1(als E ATPase angegeben) zu extrahiertem Protein im Rekonstitutionsansatz



2.2 Extraktion ATPase-freier Membranvesikel mit verschiedenen Detergentien

Von ATPase-freien Membranvesikeln werden mit Desoxycholat, Taurodesoxycholat, Triton-X-100, LDO und S10/8 Extrakte hergestellt und diese mit F_1 und Phospholipid zu Proteoliposomen rekonstituiert. Mit den verschiedenen Detergentien werden ungefähr gleiche Proteinmengen extrahiert - 25-40% des Membranproteins -. Eine ATP-abhängige Energieübertragung läßt sich nur mit Desoxycholat- und Taurodesoxycholatextrakten rekonstituieren (Tab.6). Das könnte darauf zurückzuführen sein, daß die Rekonstitutionsmethode in Gegenwart anderer Detergentien versagt. Diese Möglichkeit kann ausgeschlossen werden: Zusatz von

50 nMol (s. x) Triton-X-100 bzw. LDO bzw. S10/8 hat keinen Einfluß auf die Rekonstitution eines Taurodesoxycholatextraktes zu energieübertragenden Proteoliposomen.

Tab.6 Extraktion ATPase-freier Membranvesikel mit verschiedenen Detergentien

ATPase-freie Membranvesikel werden in Puffer (B) mit den angegebenen Mengen an Detergenz extrahiert (4.13) und die Extrakte mit F_1 und Phospholipd zu Proteoliposomen rekonstituiert; ATP-abhängige Energieübertragung wird im Fluoreszenztest gemessen (4.15.4, 4.10.4).

Extraktion mit	extrahiertes Membranprotein %	Aktivität im Fluoreszenztest E_{F1} / mg
5mM DOC	39	18
5mM TDOC	42	35
6mM Triton -X-100	35	1
10mM LDO	35	1
40mM S10/8	26	1

2.3 Extraktion von F_0 mit Taurodesoxycholat: Optimierung der Extraktionsbedingungen

Taurodesoxycholat besitzt gegenüber Desoxycholat mehrere Vorteile. Die Aktivitäten von Taurodesoxycholatextrakten liegen höher als die von Desoxycholatextrakten (Tab.6). Der niedrige pK-Wert der Sulfonylgruppe ermöglicht es, in einem wesentlich weiteren pH--Bereich zu arbeiten. Bei pH 7,5 und $0^{o}C$ neigen desoxycholathaltige Lösungen zur Gelbildung; bei niedrigen Salzkonzentrationen fällt ein Mg - Desoxycholat Komplex aus. Dies ist bei Taurodesoxycholat nicht der Fall.

x bei der Rekonstitution von Proteoliposomen mit Triton-, LDO- und S10/8 -Extrakten beträgt die Detergenzmenge im Rekonstitutionsansatz 50 nMol (4.15.4).

ATPase-freie Membranvesikel werden bei einer Proteinkonzentration von 6 mg/ml mit steigenden Mengen an KCl und Taurodesoxycholat inkubiert. Nach Abzentrifugation der Membranreste werden die Extrakte auf 1 M KCl und 6mM Taurodesoxycholat eingestellt und mit Phospholipid und F_1 zu Proteoliposomen rekonstituiert. Die ATP-abhängige Energieübertragung wird im Fluoreszenztest bestimmt.

Abbildung 10 A zeigt, daß die Menge an extrahiertem Protein mit zunehmender Detergenz- und Salzkonzentration steigt. Aus Abbildung 10 B ist zu sehen, daß nur die in Gegenwart höherer Salzkonzentrationen hergestellten Extrakte Proteoliposomen mit zufriedenstellender energieübertragender Aktivität ergeben. Mit 50mM KCl wird bei 32mM Taurodesoxycholat ungefähr diegleiche Menge Protein extrahiert wie mit 100mM KCl bei 16mM Taurodesoxycholat (Abb.10A). Die energieübertragende Aktivität von Proteoliposomen des 100mM KCl Extraktes liegt jedoch wesentlich höher (Abb.10B). Die Proteoliposomen mit der höchsten energieübertragenden Aktivität erhält man aus Extrakten, die mit 16mM Taurodesoxycholat und 600mM KCl hergestellt werden.

2.4 Stabilität von F_0 in taurodesoxycholathaltigen Puffern

Eine Voraussetzung zur Reinigung eines aktiven Enzyms ist eine hinreichende Stabilität über die für die Reinigung benötigte Zeit. Daher wird die Stabilität von F_0 unter verschiedenen Bedingungen getestet. Bei vielen Trennungsmethoden wird die Probe stark verdünnt, daher wird als Proteinkonzentration bei den Stabilitätstests 0,5 mg/ml gewählt. In Tris-Acetat Puffer ist F_0 bei pH 7 stabil; bei niedrigeren und höheren pH-Werten wird F_0 inaktiviert (Abb.11). In einem Na-Citrat Puffer liegt das pH-Optimum der Stabilität bei pH 6 (Abb.11). Der Komplex kann mehrere Wochen ohne Aktivitätsverlust in einem Imidazol Puffer (G) pH 7 aufbewahrt werden. Der Zusatz von 10% Methanol, 20% Glycerin, 175 mM KCl oder 200 mM $NaClO_4$ beeinflußt die Stabilität von F_0 nicht.

Abb.10 Extraktion ATPase-freier Membranvesikel in Abhängigkeit von der KCl- und Taurodesoxycholatkonzentration

ATPase-freie Membranvesikel werden bei verschiedenen KCl- und TDOC-Konzentrationen extrahiert (4.13). Die Extrakte werden unter identischen Bedingungen mit F_1 und Phospho= lipid zu Proteoliposomen rekonstituiert und die ATP-ab= hängige Energieübertragung im Fluoreszenztest gemessen (4.15.4, 4.10.4). In A ist der Proteingehalt der Extrakte (Ordinate) in Abhängigkeit von der TDOC-Konzentration auf= gezeichnet. In B sind die spezifischen Aktivitäten der Proteoliposomen (Ordinate) in Abhängigkeit von der TDOC- -Konzentration während der Extraktion (Abszisse) dargestellt.

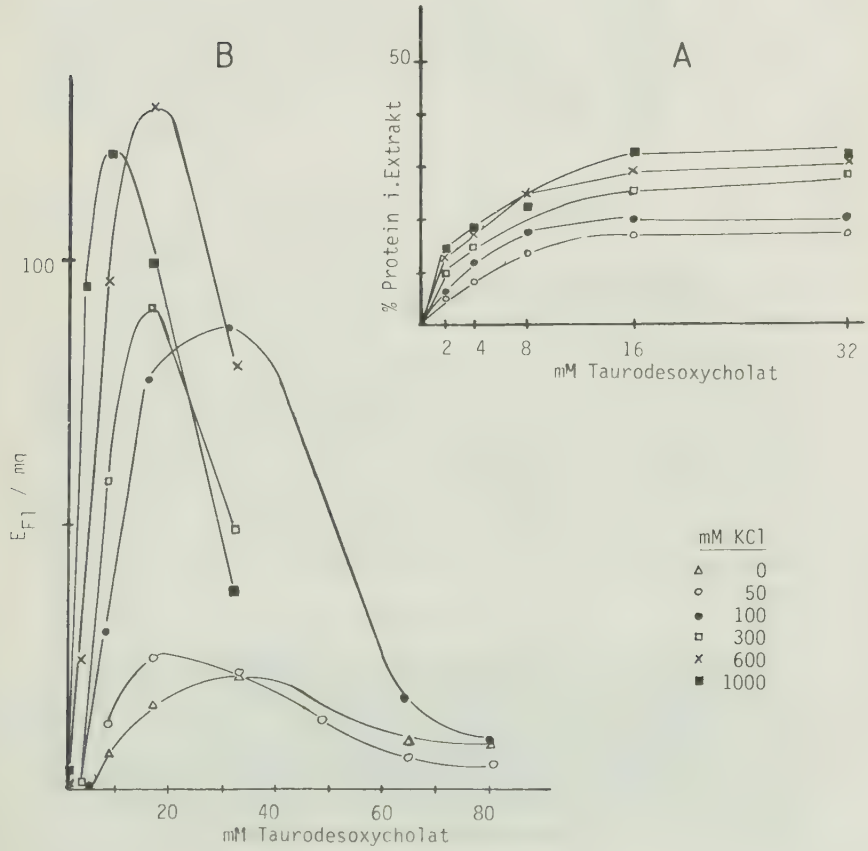
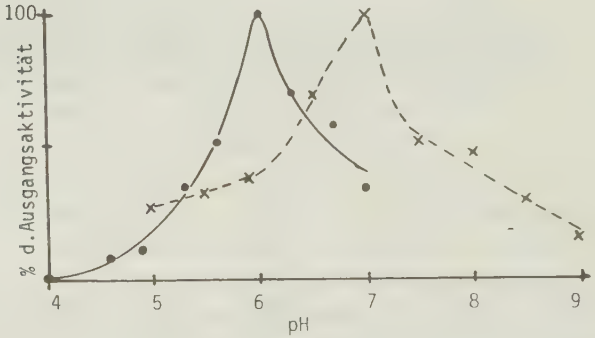


Abb.11 Stabilität von F_0 in Abhängigkeit vom pH

ATPase-freie Membranextrakte werden 3 Tage in Tris-Acetat Puffer (-×-×-) bzw. Na-Citrat Puffer (—●—) inkubiert und dann mit F_1 und Phospholipid zu Proteoliposomen rekonstituiert (4.16.1). Die ATP-abhängige Energieüber= tragung wird im Fluoreszenztest gemessen. Die spezifische Aktivität vor Beginn des Stabilitätstests beträgt 100%.



2.5 Versuche zur Anreicherung von F_0

Zur Auftrennung von Extrakten ATPase-freier Membranvesikel werden verschiedene Methoden ausprobiert: Chromatographie an Carboxymethyl-Cellulose, Chromatographie an Hydroxylapatit, Chromatographie an Phenyl-Sepharose, Zentrifugation in einem Glyceringradienten und Gelfiltration auf Agarose 0,5m. Eine Chromatographie an DEAE--Cellulose ist nicht möglich, da Taurodesoxycholat unter den Startbedingungen - Puffer (0) - vollständig an die DEAE-Cellulose bindet.

Der größte Teil des im Extrakt vorhandenen Proteins wird ebenso= wenig wie F_0 an die Carboxymethyl-Cellulose gebunden. 85% des aufgetragenen Proteins eluieren im Startpuffer (4.16.4). Rekonstitution des Proteins zu Proteoliposomen und Messung der Energieübertragung im Fluoreszenztest zeigt, daß die spezifische Aktivität des eluierten Proteins unverändert bleibt.

50% des Proteins bindet unter den angegebenen Bedingungen (4.16.5) an Hydroxylapatit und läßt sich mit 500 mM Phosphat eluieren. Die spezifische Aktivität des nicht gebundenen Proteins ist unverändert, das mit 500 mM Phosphat eluierte Protein ist inaktiv.

50% des Proteins binden unter den angegebenen Bedingungen (4.16.6) an Phenyl-Sepharose und werden mit 6 mM Taurodesoxycholat eluiert. Das nicht gebundene und das eluierte Protein zeigen im Fluoreszenztest die gleiche spezifische Aktivität wie der Auftrag.

Abb.12 Zentrifugation eines ATPase-freien Extraktes im Glycerin-Dichtegradienten

Ein ATPase-freier Extrakt wird einer Zentrifugation in einem 10-30%(w/v) Glyceringradienten unterworfen (4.16.2) Ordinate: Proteingehalt gemessen als E_{280}, Abszisse: Fraktion

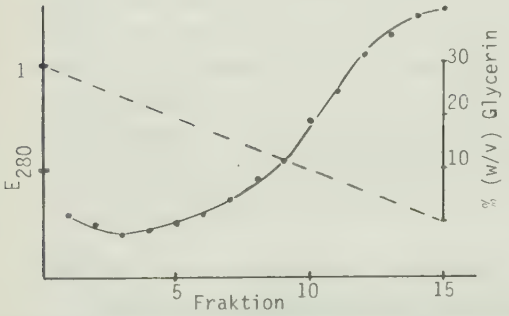


Abb. 12 zeigt die Proteinverteilung in einem Glycerin-Dichtegradienten (4.16.2). In den vereinigten Fraktionen 1-5, 6-10 und 11-15 ist die spezifische Aktivität im Fluoreszenztest ungefähr gleich und beträgt 27-35% der Ausgangsaktivität.

Abb.13 Gelfiltration ATPase-freier Extrakte auf Agarose 0,5m

Ein ATPase-freier Extrakt wird einer Gelfiltration auf Agarose 0,5m unterworfen (4.16.3). Ordinate: Protein= gemessen als E_{280} Abszisse: Fraktion

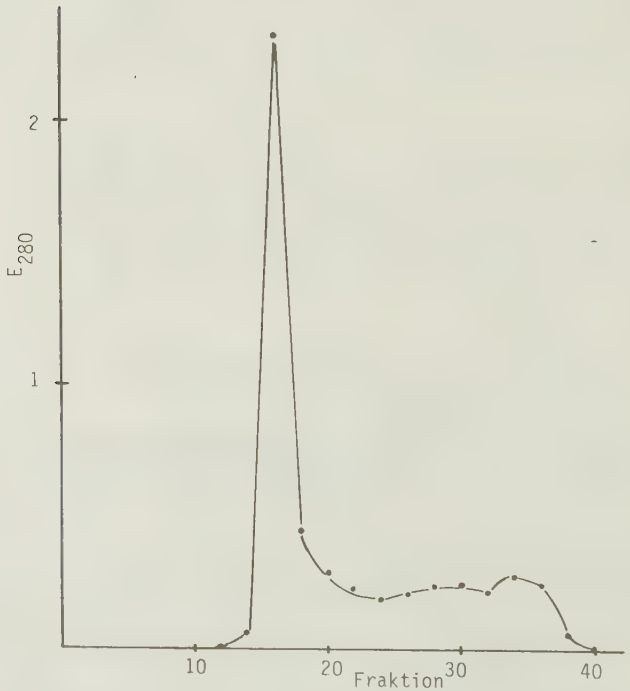


Abb. 13 zeigt das Ergebnis einer Taurodesoxycholat-Gelfiltration auf Agarose 0,5 m. F_0 läßt sich nur im Ausschußvolumen der Säule (Frakt. 16) durch den Fluoreszenztest nachweisen. Die Fraktionen 19-42 sind inaktiv. Die spezifische Aktivität in Fraktion 16 ist 1,5fach erhöht. Die Ausschlußgrenze von Agarose 0,5 m liegt mit globulären Proteinen bei einem Mole-

kulargewicht von 500.000. Das Molekulargewicht von F_0 wird auf 100.000-150.000 geschätzt (Hare, 1975), dennoch eluiert es im Ausschlußvolumen der Säule. Dies kann nicht an der Größe der Taurodesoxycholat-Micellen liegen, da die Aggregationszahl von Taurodesoxycholat 2-4 Moleküle pro Micelle beträgt (Kagawa,1972). Eine mögliche Erklärung ist: F_0 liegt ausschließlich in Aggregaten mit einem Molekulargewicht $\geq$ 500.000 vor. Eine andere Möglichkeit ist: F_0 liegt teils in Aggregaten, teils monodispers vor. In monodisperser Form wird F_0 unter den gewählten Bedingungen inaktiviert oder läßt sich mit der Rekonstitutionsmethode nicht mehr in Proteoliposomen einbauen.

3. Versuche zur Reinigung der ATP-Synthetase (F_1F_0)

3.1. Methode nach Hare

Eine DCCD-hemmbare ATPase-Aktivität wird mit Desoxycholat aus Membranvesikeln extrahiert und durch eine Sucrose-Dichtegradientenzentrifugation angereichert (Hare, 1975). Mit einer ähnlich angereicherten Enzympräparation, die jedoch noch Cytochrome enthält, können Proteoliposomen rekonstituiert werden, die im Fluoreszenztest eine geringe ATP-abhängige Energieübertragung zeigen (Postma et al. 1975). Im Folgenden wird die Wiederholung dieser Versuche beschrieben.

Aus Tab. 7 ist zu ersehen, daß die spezifischen ATPase-Aktivitäten von Membranvesikeln, Extrakt und Konzentrat mit den Angaben von Hare übereinstimmen, die Ausbeuten aber erheblich niedriger liegen. Der für die Reinigung entscheidende Schritt ist die Zentrifugation im Dichtegradienten. Abb. 14 zeigt die Aktivitäts- und Proteinverteilung im Gradienten.

Tab.7 Anreicherung der ATP-Synthetase nach Hare

Membranvesikel werden in Gegenwart von KCl mit DOC inkubiert, die Membranreste abzentrifugiert und der Überstand gegen detergenz- und salzfreien Puffer dialysiert. Der auftretende Niederschlag wird abzentrifugiert, in Puffer aufgenommen und mit DOC dispergiert. Das Konzentrat wird auf einen linearen, h Sucrose-Gradienten, 10-40%(w/w), aufgetragen und 15 bei 160000xg in einem Schwenkbecher-Rotor zentrifugiert. Nähere experimentelle Einzelheiten sind Referenz (Hare, 1975) zu entnehmen. Die in Klammern gesetzten Werte sind der Arbeit von Hare entnommen.

Fraktion	ATPase-Aktivität		Aktivität im Fluoreszenztest
	spez.Akt. E / mg	ges.Akt. %	E_{F1} / mg
Membran= vesikel	0,32 (0,27)	100 (100)	50
Extrakt	0,38 (0,31)	37 (66)	75
Konzentrat	0,44 (0,42)	27 (50)	116
Gradienten= fraktion			
- PL	0,7 (2,32)	5 (n.b)	n.b.
+ PL	0,7 (5,53)	5 (14)	47

PL = Phospholipid , n.b.= nicht bestimmt

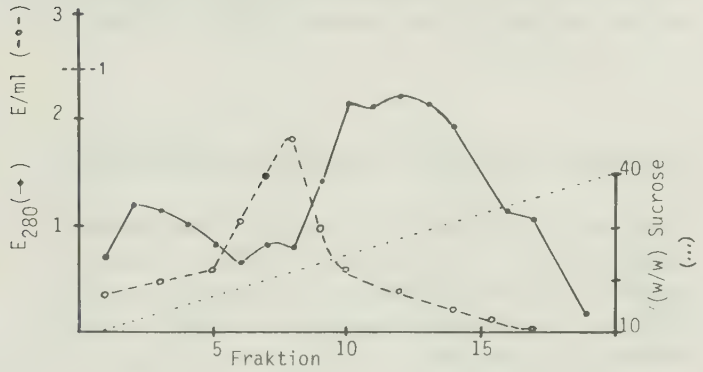
Tab.8 Ammoniumsulfat-Fraktionierung von Desoxycholat-Extrakten

DOC-Extrakte werden mit Ammoniumsulfat (0-25%, 25-50%) fraktioniert (4.17). Das fraktionierte Protein wird zu Proteoliposomen rekonstituiert und der ATP-32P-Austausch gemessen. (4.15.4, 4.10.4)

Fraktion	ATPase-Aktivität		ATP-$^{32}P_i$-Austausch
	spez.Akt. E/mg	ges.Akt. %	nMol(γ-^{32}P)ATP/min mg
Membran= vesikel	0,7	100	2,3
Extrakt	1,1	50	2,1
25-50% Fraktion	2,5	14	6,5

Abb.14 Zentrifugation eines Desoxycholat-Extraktes im Sucrose-Dichtegradienten

Einzelheiten siehe Legende Tab.7, Ordinate: Proteingehalt gemessen als E_{280}(-•-) bzw. ATPase-Aktivität in E/ml(-•-), Abszisse: Fraktion



Die ATPase-Aktivität läßt sich nicht wesentlich anreichern und läßt sich auch durch Phospholipid nicht erhöhen. Die spezifische ATPase-Aktivität ist maximal 2fach höher als die des Auftrags; 80% der Aktivität geht verloren (Tab. 7). $MgCl_2$ stabilisiert den Zusammenhalt des F_1F_o-Komplexes und Methanol stabilisiert die ATPase-Aktivität von F_1. Zusatz von 1 mM $MgCl_2$ und 5% Methanol zum Gradienten bringt keine Verbesserung der Reinigung oder Erhöhung der Ausbeute. Gradientenfraktionen zeigen nach Rekonstitution zu Proteoliposomen eine geringere Aktivität im Fluoreszenztest als der Auftrag (Tab. 7).

3.2 Fraktionierung durch Ammoniumsulfat-Fällung

Verschiedene, mit Gallensäure gelöste Membranproteine können durch Ammoniumsulfat-Fällung angereichert werden (Tzagoloff & Penefsky, 1971). Aus Taurodesoxycholat-Extrakten läßt sich die ATPase-Aktivität durch Ammoniumsulfat-Fällung nicht anreichern. Das ausgefällte Protein zeigt nach Rekonstitution zu Proteoliposomen keine Aktivität im Fluoreszenztest mehr. Mit Desoxycholat-Extrakten ist hingegen eine Fraktionierung durch Ammoniumsulfat-

Fällung möglich. Tab.8 zeigt, daß die ATPase-Aktivität 3,5fach angereichert ist. Die angereicherte Präparation wird zu Proteoliposomen rekonstituiert. Sie zeigt eine erhöhte ATP-$^{32}P_i$-Austausch Aktivität. Die Ausbeute an ATPase-Aktivität beträgt nach der Fraktionierung mit Ammoniumsulfat nur 10-20%.

3.3. Trennung von Desoxycholat-Extrakten auf DEAE-Cellulose

Als weiterer Reinigungsschritt wird eine Ionenaustauscher-Chromatographie auf DE-52 Cellulose versucht. F_1 ist ein wasserlösliches, bei pH 8 negativ geladenes Protein; F_o ist durch Lipid oder Detergenz abgedeckt und unpolar. F_1 (Molekulargewicht ca. 340.000) stellt den größten Teil des F_1F_o-Komplexes (Molekulargewicht ca. 500.000). Die Bindung des Komplexes an DEAE-Cellulose sollte daher durch F_1 bestimmt sein. F_1 wird mit bzw. ohne Desoxycholat auf DE-52 Cellulose chromatographiert. Die ATPase-Aktivität läßt sich mit 230 mM KCl eluieren. Die Ausbeute beträgt 90% der eingesetzten ATPase-Aktivität. Desoxycholat hat keinen Einfluß auf die Elution des Enzyms.

Eine durch Ammoniumsulfat-Fällung angereicherte ATP-Synthetase Präparation wird an eine DE-52 Säule adsorbiert und mit Puffern steigender Ionenstärke das Protein stufenweise eluiert (4.19). Zunächst wird auf eine weitergehende Reinigung verzichtet und das Enzym nach Waschen mit 100mM KCl möglichst konzentriert mit 400mM KCl eluiert (Abb.15A). Deshalb ist die ATPase-Aktivität nur geringfügig angereichert. Sie läßt sich mit Phospholipid stimulieren und durch DCCD hemmen (Tab.9). Das eluierte Protein wird mit Phospholipid zu Proteoliposomen rekonstituiert. Mit diesen läßt sich im ATP-$^{32}P_i$-Austausch und im Fluoreszenztest eine ATP-abhängige Energieübertragung nachweisen. Um eine bessere Reinigung der ATP-Synthetase zu erzielen, wird in einem weiteren Versuch das

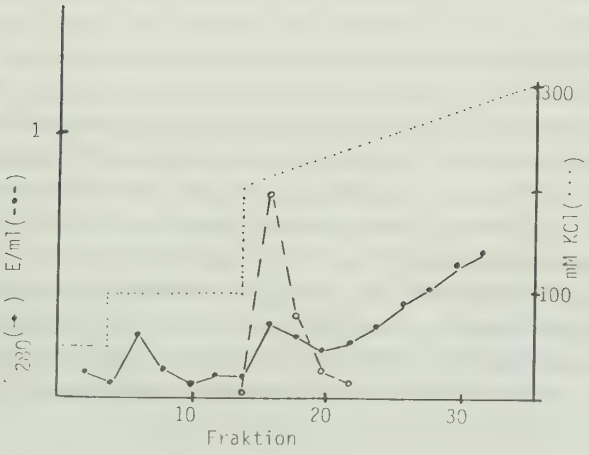
Abb.15 DEAE-Chromatographie von Desoxycholat-Extrakten

Eine durch Ammoniumsulfat-Fällung angereicherte ATP-Synthetase Präparation wird an DE-52 Cellulose adsorbiert. A : Elution der ATP-Synthetase mit 400 mM KCl B : Elution mit einem linearen KCl-Gradienten (200-400 mM).

A

B

s.o.



Tab.9 DEAE-Chromatographie von Desoxycholat-Extrakten

DOC-Extrakte werden einer DEAE-Chromatographie unterworfen (Einzelheiten siehe Legende Abb.15). Die Fraktionen mit der größten spez.ATPase-Aktivität werden mit Phospholipid zu Proteoliposomen rekonstituiert (4.15.4) und die ATP-32P-Austausch Aktivität bestimmt (4.10.3).

Fraktion	ATPase-Aktivität E/mg		Hemmung mit 50µM DCCD	ATP-$^{32}P_i$-Austausch
	-PL	+PL	%	nMol(γ-^{32}P)ATP/min·mg
Auftrag	0,8	0,8	85	2
aktivste Fraktion nach Elution mit				-
400mM KCl	0,9	1,5	55	3
Gradient	12	11	0	0,1

Enzym mit einem linearen KCl-Gradienten eluiert (Abb. 15 B). Die spezifische ATPase-Aktivität wird dabei in einigen Fraktionen auf 12 E/mg angereichert. Sie läßt sich jedoch nicht mit Phospholipid stimulieren oder durch DCCD hemmen (Tab. 9). Nach Rekonstitution dieser Fraktionen zu Proteoliposomen läßt sich keine ATP-abhängige Energieübertragung nachweisen. Während also die erste Präparation Eigenschaften einer ATP-Synthetase aufweist - Phospholipidabhängigkeit und DCCD-Hemmbarkeit der ATPase, energieübertragende Aktivität in Proteoliposomen -, läßt sich in der zweiten Präparation nur eine ATPase-Aktivität nachweisen. Die ATP-Synthetase scheint im Laufe der DEAE-Chromatographie in F_1 und F_o zu dissoziieren. Anscheinend hängt der Grad der Dissoziation von der Intensität der Reinigung ab (vgl. Abb. 15 A mit 15 B). Weitere Versuche zeigen, daß eine Anreicherung der ATP-Synthetase auf diese Weise nicht möglich ist.

3.4. Wirkung von Proteaseinhibitoren

Die Nitrat-Reduktase von E. coli ist ein membrangebundenes Enzym. Sie kann durch Hitzebehandlung von der Membran abgelöst werden. Dies beruht auf der Wirkung einer membrangebundenen Protease (MacGregor, 1975). Nach Hemmung der Protease durch den Inhibitor p-Aminobenzamidin (PAB) kann das Enzym nicht abgelöst werden. PAB verhindert ebenfalls, daß F_1 mit Puffern niederer Ionenstärke von der Membran entfernt werden kann (Cox et al., 1978). Der Einfluß von PAB auf die Menge des ablösbaren Proteins ist gering. Von Membranvesikeln, die mit Puffern niederer Ionenstärke in Gegenwart von PAB gewaschen worden sind, kann mit Cholat weiteres Protein entfernt werden, ohne daß F_1 abgelöst wird (Tab. 10). Der Proteaseinhibitor Phenylmethansulfonylfluorid (PMSF) verhindert die Ablösung von F_1 nicht.

3.5. Reinigung der ATP-Synthetase

Membranvesikel werden in Gegenwart von PAB mit Puffer niederer Ionenstärke und mit Cholat gewaschen. Anschließend werden die Membranvesikel mit Detergenz Acyl (C_{11}-C_{17}) amidopropyldimethylaminoxid (AO) extrahiert. Der Extrakt wird an DEAE-Sepharose aufgetrennt. Fraktionen mit einer spezifischen ATPase-Aktivität > 12 E/mg werden vereinigt und das Enzym über Nacht abzentrifugiert. Abb.16 zeigt den Verlauf der DEAE--Chromatographie. Mit 200mM KCl werden 90% der aufgetragenen ATPase-Aktivität eluiert. Die spezifische Aktivität der Haupt= fraktionen beträgt ca. 18 E/mg. In Tab.10 ist die Reinigung zusammengefaßt : die ATPase-Aktivität ist ca. 18fach angereichert, insgesamt beträgt die Ausbeute ca. 20%. Nach Rekonstitution zu Proteo-

Tab.10 Reinigung der ATP-Synthetase

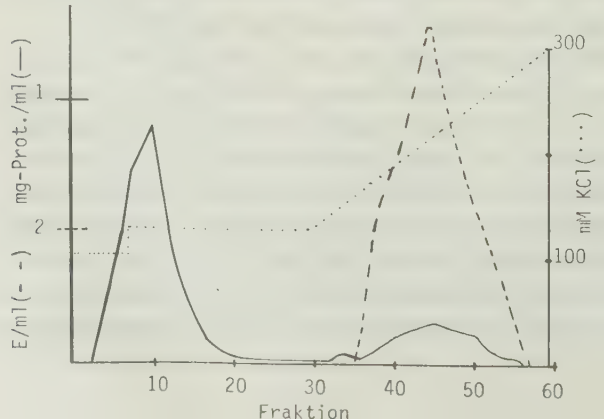
Membranen werden mit Puffern niederer Ionenstärke sowie mit Cholat gewaschen und die ATP-Synthetase mit AO extrahiert (4.11.2, 4.14.3 u. 4.20). Der Extrakt wird auf DEAE-Sepharose chromatographiert. Fraktionen mit einer spez.ATPase-Aktivität > 12 E/mg werden vereinigt und das Enzym über Nacht abzentrifugiert. Die ATP-Synthetase Präparation wird mit Phospholipid zu Proteoliposomen rekonstituiert und ATP-abhängige Energieübertragung im Fluoreszenztest gemessen.

Fraktion	Protein	ATPase-Aktivität		Aktivität im Fluoreszenztest
	mg / ml	gesamt E	spezifisch E / mg	E_{F1} / mg
Membranvesikel	306	310	1,0	80
nach Waschen mit Cholat	170	270	1,6	n.b.
AO-Extrakt	50	210	4,2	270
Fraktionen des DEAE--Eluates	7	140	18	1200
sediment. Enzym	6	86	14	700

n.b. = nicht bestimmt

Abb.16 DEAE-Chromatographie von Aminoxid-Extrakten

Einzelheiten siehe Legende Tab.10



liposomen wird die ATP-abhängige Energieübertragung im Fluoreszenztest bestimmt. Ein Vergleich der spezifischen Aktivitäten im Fluoreszenztest zeigt, daß ein F_1F_0-Komplex mit energieübertragender Aktivität angereichert worden ist. Abb.17 zeigt die densitometrische Auswertung eines SDS-Polyacrylamidgeles nach Elektrophorese der ATP-Synthetase. Zur ATP-Synthetase sind die Banden mit den folgenden scheinbaren Molekulargewichten zu rechnen (vgl. 2.4.3): α 56000, ß 52000, γ 32000, a 27000, δ 22000, b 19000, ε 13000, c 8500 (s. x).

Bei der Reinigung werden über 90% des Phospholipids abgetrennt (Tab.11). Durch Zugabe von Phospholipid wird die ATPase-Aktivität des gereinigten Enzyms 4fach gesteigert. Vor Zugabe des Phospholipids hat DCCD keinen Einfluß auf die ATPase-Aktivität; nach Zugabe des Phospholipids wird die ATP-Hydrolyse durch DCCD zu 75% gehemmt (Tab.11).

b.11 Phospholipidbedürfnis der ATP-Synthetase

Der Phosphatgehalt von Membranvesikeln und einer ATP-Synthetase Präparation wird bestimmt (Ames & Tubin, 1960). Die ATPase-Aktivität und die Hemmung der ATP-Hydrolyse durch 50µM DCCD werden vor und nach Zugabe von Phospholipid (3µMol/mg Prot.) gemessen.

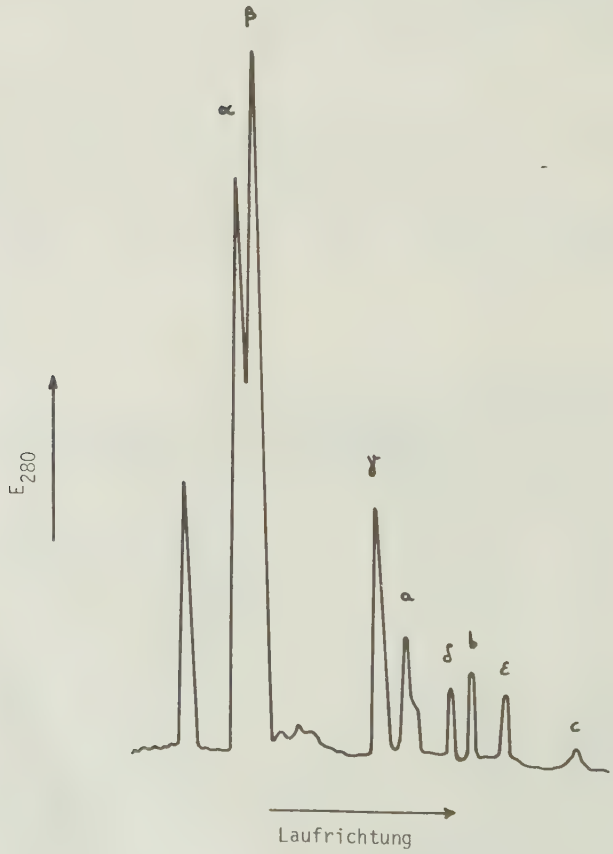
Fraktion	Phospholipid gehalt µMol (P)/mg Prot.	spez.ATPase Aktivität E/mg		DCCD-Hemmung %	
		-PL	+PL	-PL	+PL
Membran= vesikel	1,5	1	n.b.	85	n.b.
ATP-Synthe= tase Präp.	0,1	3,3	14,3	2	75

n.b.= nicht bestimmt

x) in der Gelelektrophorese zeigte das Protein c ein apparentes Molekulargewicht von 4500; eskonnte aber durch Vergleich mit gereinigtem Protein c eindeutig identifiziert werden.

Abb.17 SDS-Gelelektrophorese der ATP-Synthetase

Das sedimentierte Enzym (s.Legende Tab.10) wird einer SDS-Gelelektrophorese unterworfen (4.22.1) und das Gel densitometrisch ausgewertet.



4. Identifizierung der Untereinheiten der ATP-Synthetase

Sechs verschiedene Untereinheiten der ATP-Synthetase sind eindeutig identifiziert: die fünf Polypeptidketten von F_1 sowie die DCCD-bindende Untereinheit von F_o.

Eine SDS-Gelelektrophorese der ATP-Synthetase Präparation genügt nicht um zu entscheiden, ob alle auftretenden Polypeptide Untereinheiten der ATP-Synthetase sind oder ob sie Verunreinigungen darstellen.

Mit Antikörpern gegen F_1 wird ein Komplex ausgefällt, der in der SDS-Gelelektrophorese neben den bekannten sechs Untereinheiten eine weitere Polypeptidkette mit einem apparenten Molekulargewicht von 27.000 zeigt (Hare, 1975). Der starke Untergrund des Gelbildes weist daraufhin, daß der Komplex vor der Fällung nicht monodispers vorlag. Dadurch kann nicht ausgeschlossen werden, daß das Polypeptid eine Verunreinigung darstellt.

Simoni und Shandell (1975) vergleichen SDS-Polyacrylamidgele von Membranproteinen des Wildtyps mit denen von unc-Mutanten (s. x). In einer Mutante fehlt ein Protein mit apparentem Molekulargewicht 54000. Nach Reversion zum Wildtyp taucht das Protein wieder auf. Da ATPase-freie Membranvesikel miteinander verglichen werden, folgern die Autoren, daß es sich um eine Untereinheit von F_0 handelt.

x In E.coli wird die ATP-Synthetase von den unc-Genen kodiert; sie liegen auf dem Genom in Nachbarschaft der ilv-Gene bei der Genminute 83 (Bachmann et al., 1976).

4.1. Konstruktion der Stämme

Eine Mutante, bei der alle unc-Gene deletiert sind, eignet sich ideal zur Identifizierung der Untereinheiten durch vergleichende SDS-Gelelektrophorese. Die DNA des Bakteriophagen Mu kann an jeder Stelle des E. coli Genoms integriert werden. Der Einbau führt zu einer hochpolaren Mutation im betroffenen Operon. Liegt die Insertionsstelle dicht hinter dem Promotor, so wirkt die induzierte Mutation wie eine Deletion des Operons.

Vom Wildtyp und von verschiedenen Mu-lysogenen unc-Mutanten werden ATPase-freie Membranen hergestellt und nach Unterschieden im Proteinmuster der SDS-Gelelektrophorese gesucht. Im Folgenden werden die Versuche mit der Mutante AS12 beschrieben. Sie unterscheidet sich vom Ausgangsstamm A1 durch Aminosäureauxotrophien und einen in die unc-Gene integrierten Mu-Phagen (4.2). Die Integration des Phagen könnte, unabhängig vom betroffenen Gen, in mittelbarer Weise die Zusammensetzung der Membran verändern. Ein Einfluß der verschiedenen Aminosäure-Auxotrophien sowie des Wachstums bei 32°C läßt sich ebenfalls nicht ausschliessen. (Der verwandte Mu-Phage besitzt einen thermosensitiven Repressor; bei höherer Temperatur wird der Phage induziert) Um diese Einwände zu entkräften, werden die Stämme möglichst weitgehend angeglichen. Die Mutante AS12 wird durch eine P_1-Transduktion prototroph für Aminosäuren (AM12). Durch eine weitere P_1-Transduktion wird das unc^+-Allel in AM12 hineingekreuzt (R12); dabei geht der Mu-Phage verloren. Um möglichst identische Vergleichsstämme zu erhalten, werden von R12 sowie vom Wildtyp A1 Mu-induzierte histidinauxotrophe Stämme isoliert (A1 zu AM1 und R12 zu AC12). Zur Lokalisation des Phagen werden AM1 und AC12 einer P_1-Transduktion unterworfen und Stämme isoliert, die für Histidin prototroph sind. Sämtliche his^+-Transduktanten sind nicht mehr Mu-lysogen. Daraus folgt, daß der Mu-Phage bei AM1 und AC12 im his-Operon integriert ist. Die beiden Referenzstämme AM1 und AC12 sowie die Mutante AM12 sind damit möglichst weitgehend angeglichen. AC12 ist vom apparenten Genotyp her mit AM1 identisch, besitzt aber den genetischen Hintergrund der Mutante AM12.

4.2. Charakterisierung der Mutante AM12

Membranvesikel der Stämme AM1 und AC12 zeigen die gleiche spezifische ATPase-Aktivität und ATP-abhängige Energieübertragung wie der Wildtyp A1.

Membranvesikel der Mutante AM12 besitzen keine ATPase-Aktivität und zeigen keine ATP-abhängige Energieübertragung. AM12 kann eine Mutante vom uncA-Typ (F_1 defekt, F_o intakt) oder vom uncAB-Typ (F_1 und F_o defekt) sein. Die beiden Typen von unc-Mutanten unterscheiden sich in ihrer Atmungs-abhängigen Energieübertragung in ATPase-freien Membranvesikeln (Schairer et al., 1976). ATPase-freie Membranvesikel mit einem intakten F_o zeigen eine teilweise Entkopplung der Atmungs-abhängigen Energieübertragung; Bindung von F_1 oder DCCD an F_o stellt die Kopplung wieder her. Membranvesikel von AM12, die mit Puffern niederer Ionenstärke gewachsen wurden, sind in ihrer Atmungs-abhängigen Energieübertragung nicht beeinträchtigt. Zugabe von F_1 oder DCCD stimuliert die Atmungs-abhängige Energieübertragung nicht. Mit intaktem F_1 kann bei diesen Vesikeln keine ATP-abhängige Energieübertragung rekonstituiert werden. Die Mutante AM12 ist dem uncAB-Typ zuzuordnen.

Die cytoplasmatische Fraktion und die bei der Herstellung ATPase-freier Membranvesikel erhaltenen Überstände werden in einem Ouchterlony-Doppeldiffusionstest mit Antikörpern gegen F_1 getestet. Die Fraktionen von AM1 und AC12 enthalten antigenes Material; in den Fraktionen von AM12 läßt sich kein antigenes Material nachweisen (Abb. 18).

4.3. Vergleichende SDS-Gelelektrophorese der Membranproteine von Wildtyp und Mutante

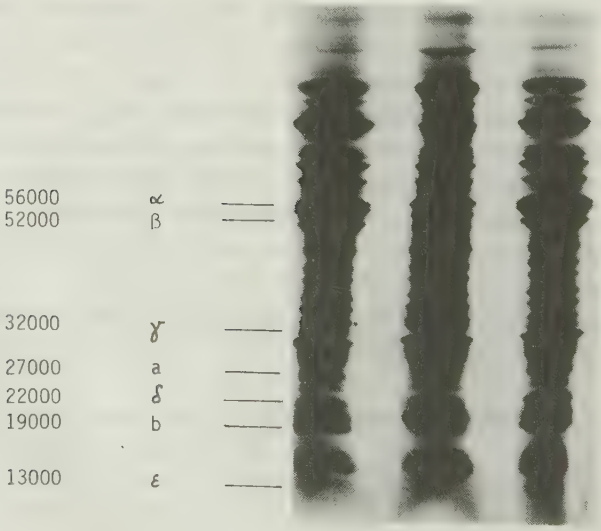
In einer analytischen SDS-Gelelektrophorese können 50-80 µg Membran-

Abb.18 Nachweis von antigenem Material im Ouchterlony Doppeldiffusionstest

Die cytoplasmatische Fraktion und die bei der Herstellung ATPase--freier Membranvesikel erhaltenen Überstände werden vereinigt und das Protein konzentriert (4.21). 300µg Protein werden im Test eingesetzt. Im mittleren Loch werden Anti-F_1 Immunoglobuline aufgegeben.

Abb.19 SDS-Gelelektrophorese der Membranproteine von AM1 AM12 und AC12

AO-Extrakte von AM1, AM12 und AC12 Membranvesikeln werden einer SDS-Gelelektrophorese unterworfen (4.11.3, 4.14.3 u.4.22.1). Die angegebenen Molekulargewichte werden durch Vergleich mit Eichproteinen (BSA, α, ß, ADH, γ, STI, Lysozym, Cyt c, Aprotinin, Insulin B-Kette) ermittelt.



protein aufgetrennt werden. Die Untereinheiten der ATP-Synthetase stellen nur einen kleinen Bruchteil der Membranproteine und sollen durch Unterschiede im Proteinmuster des Wildtyps und der Mutante identifiziert werden. Um die Proteinunterschiede stärker hervorzuheben, wird die ATP-Synthetase teilweise angereichert.

Membranvesikel werden in Gegenwart von PAB isoliert, mehrfach mit Puffer niederer Ionenstärke sowie mit Cholat gewaschen und mit Betain extrahiert (4.11.3). Im Extrakt ist die ATP-Synthetase ca. 5fach angereichert. Das Protein wird in einer SDS-Gelelektrophorese auf einem Polyacrylamid-Porengradientengel aufgetrennt (4.22.1).

Abb. 19 zeigt die Proteinmuster in Extrakten von AM1, AM12 und AC12. Bei AM12 fehlen eindeutig 7 Polypeptidketten. Die apparenten Molekulargewichte werden durch Vergleich mit folgenden Eichproteinen ermittelt: BSA 66.000, α 56.000, β 52.000, ADH 40.000, γ 32.000, STI 21.500, Lysozym 14.500, Cyt c 12.500, Aprotinin 6.500. Die 5 Polypeptidketten mit den apparenten Molekulargewichten 56.000, 52.000, 32.000, 22.000 und 13.000 können α, β, γ, δ und ε zugeordnet werden; die Polypeptidketten mit apparenten Molekulargewichten von 27.000 und 19.000 sind Untereinheiten von F_o.

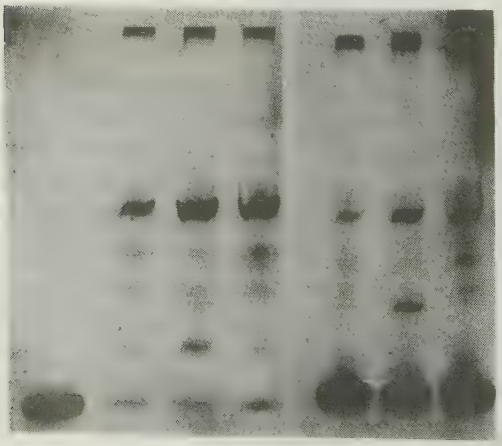
4.4. Nachweis des DCCD-bindenden Proteins

SDS-Gelelektrophorese von gereinigtem DCCD-bindenden Protein zeigt, daß das Protein im oben genannten Gelsystem (4.22.1) nur in Mengen > 4 µg nachzuweisen ist. Ob das Protein in der Mutante AM12 fehlt, kann nur durch eine Anreicherung des Proteins (Fillingame, 1975) entschieden werden. Membranvesikel von AM1, AM12 und AC12 werden mit (^{14}C)-DCCD inkubiert (Markierung des DCCD-bindenden Proteins) und mit Chloroform/Methanol extrahiert (4.24). Aus dem Extrakt wird das Protein mit Diäthyläther ausgefällt und durch eine kontinuierliche SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt (4.22.2); als Vergleich dient 20µg hochgereinigtes, DCCD-bindendes Protein. Zur Lokalisierung der Radioaktivität wird das Gel einer Fluorographie (Bonner & Laskey, 1974) unterworfen.

Abbildung 20A zeigt die Proteinverteilung nach der Elektrophorese, Abbildung 20B die zugehörige Radioaktivitätsverteilung. Auf gleicher Höhe mit dem zum Vergleich eingesetzten DCCD-bindenden Protein erscheint in den Extrakten von Wildtyp und Mutante ein Protein, das den größten Teil der im Extrakt befindlichen Radioaktivität gebunden hat. Daraus folgt, daß das DCCD-bindende Protein in der Mutante AM12 vorhanden ist.

Abb.20 SDS-Gelelektrophorese der Chloroform/Methanol-Extrakte von AM1, AM12 und AC12

Membranvesikel von AM1, AM12 und AC12 werden mit (^{14}C)-DCCD inkubiert und das DCCD-bindende Protein durch Chloroform/Methanol-Extraktion angereichert (4.24). Das Protein wird einer SDS-Gelelektrophorese unterworfen (4.22.2) und die Radioaktivität durch Fluorographie lokalisiert (4.23). A : Proteinverteilung nach der Gelelektrophorese, 1 = gereinigtes DCCD-bindendes Protein, 2 = AM1 , 3 = AM12 , 4 = AC12 . B : Radioaktivitätsverteilung, 1 = AM1, 2 = AM12, 3 = AC12 .



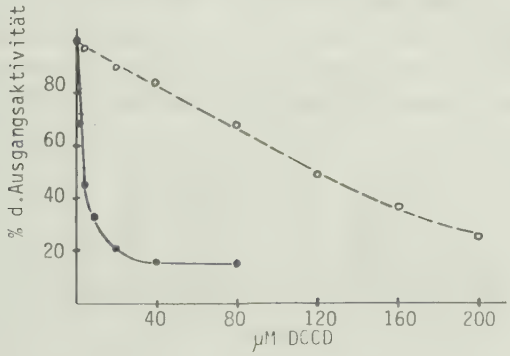
5. Charakterisierung einer DCCD-resistenten Mutante

Mutanten mit einem veränderten membranintegrierten Teil der ATP-Synthetase können zwei Typen zugeordnet werden: (a) Mutanten mit einem defekten F_0 und einer membrangebundenen ATPase, die nicht mehr durch DCCD gehemmt wird (Cox & Gibson, 1974; Daniel et al., 1975; Schairer et al., 1976), (b) Mutanten, deren membrangebundene ATPase nicht mehr durch DCCD gehemmt wird und bei denen die Funktion des Enzyms bei der oxidativen Phosphorylierung nicht beeinträchtigt ist (Fillingame, 1975). Zu diesem Typ gehört die Mutante DC1.

Die Mutation DC1 kartiert in den unc-Genen (Friedl et al., 1977). Durch die Mutation ist die DCCD-Hemmbarkeit der ATP-Synthetase geändert. Abb. 21 zeigt die Hemmung der membrangebundenen ATPase bei verschiedenen DCCD-Konzentrationen. Das Enzym des Wildtyps wird mit 50 µM DCCD maximal gehemmt, das der Mutante erst mit 200 µM DCCD. Die ATP-abhängige Energieübertragung von Membranvesikeln zeigt die gleiche Empfindlichkeit gegenüber DCCD (Tab.12).

Abb. 21 Hemmung der membrangebundenen ATPase durch DCCD

Membranvesikel des Wildtyps (—•—) und der Mutante (-•-) werden mit den angegebenen Konzentrationen an DCCD inkubiert (4.10.5). Die ATPase-Aktivität ist in % der Ausgangsaktivität angegebenen (Ordinate).



Tab.12 Funktionen der ATP-Synthetase und ihre Hemmung durch DCCD

Fraktion	ATPase-Aktivität			ATP-$^{32}P_i$-Austausch			Fluoreszenztest		
		Hemmung mit DCCD		nMol(γ-32P)ATP/min mg Hemmung mit DCCD			Hemmung mit DCCD		
	E/mg	+50µM	+200µM	+0µM	+50µM	+200µM	+0µM	+50µM	+200µM
Wildtyp									
Membranvesikel	0,7	85%	n.b.	2,3	0,1	n.b.	+	-	n.b.
ATP-Synthetase Präparation	2,5	82%	n.b.	0,1	n.b.	n.b.	-	n.b.	n.b.
Proteolipos.	n.b.	n.b.	n.b.	6,5	0,2	n.b.	+	-	n.b.
Mutante DC1									
Membranvesikel	0,7	18%	80%	2,8	2,3	0,2	+	+	-
ATP-Synthetase	3,4	27%	70%	0,1	n.b.	n.b.	-	n.b.	n.b.
Proteolipos.	n.b.	n.b.	n.b.	5,4	4,3	0,2	+	+	-

Membranvesikel und ATP-Synthetase Präparationen werden mit DCCD inkubiert (4.10.5). Die ATP-Synthese-Präparationen werden mit Phospholipid zu Proteoliposomen rekonstituiert. Die ATP-abhängige Energieübertragung von Membranvesikeln und Proteoliposomen wird durch ATP-32P-Austausch und den Fluoreszenztest gemessen. n.b. = nicht bestimmt , + bzw. - = im Fluoreszenztest aktiv bzw. inaktiv.

Membranvesikel werden mit Desoxycholat extrahiert, die ATP-Synthetase durch Ammoniumsulfat-Fraktionierung des Extraktes angereichert und mit Phospholipid zu Proteoliposomen rekonstituiert.

Die ATPase-Aktivität der ATP-Synthetase Präparationen und die ATP-abhängige Energieübertragung in Proteoliposomen zeigen die gleiche Empfindlichkeit gegen DCCD wie in Membranvesikeln (Tab.12). Die ATP-Synthetase des Wildtyps wird durch 50 μM DCCD maximal, das bei der Mutante kaum gehemmt; 200 μM DCCD hemmt das Enzym der Mutante weitgehend.

Die Änderung der DCCD-Hemmbarkeit durch die Mutation DC1 kann durch eine der folgenden Annahmen erklärt werden: (a) F_o der Mutante hat die mit DCCD reagierende Gruppe verloren oder ist strukturell so verändert, daß die Gruppe für DCCD nicht mehr zugänglich ist, (b) F_1 ist so verändert, daß die Bindung von F_1 an F_o die Zugänglichkeit der Gruppe für DCCD herabsetzt.

Durch die DCCD-Hemmbarkeit "gemischter" ATP-Synthetasen - F_1 (Wildtyp) + F_o (Mutante) bzw. F_1 (Mutante) + F_o (Wildtyp) - kann zwischen den beiden Möglichkeiten unterschieden werden. Tab. 13 zeigt, daß die Kombination F_o (Mutante) + F_1 (Wildtyp oder Mutante) eine ATP-Synthetase mit herabgesetzter Empfindlichkeit gegen DCCD ergibt; sie wird durch 50 μM DCCD zu 17% gehemmt. Die Kombination F_o (Wildtyp) + F_1 (Mutante oder Wildtyp) ergibt eine ATP-Synthetase, die durch 50 μM DCCD zu 85% gehemmt wird. Damit ist eindeutig bewiesen, daß in der ATP-Synthetase von DC1 F_o verändert ist.

Tab. 13 Identifizierung des veränderten Teils der ATP-Synthetase DC1

ATPase-freie Membranvesikel (10mg Protein) von A1 bzw. DC1 werden mit 10E F_1 von DC1 bzw.A1 gemischt und 60 min bei 25 °C inkubiert. Die Suspension wird 90 min bei 160.000xg zentrifugiert und das Sediment in Puffer A aufgenommen. Hemmung mit DCCD erfolgt wie in (4.10.5) beschrieben.

Stamm ATPase-freie Membranvesikel	F_1	ATPase-Aktivität E/mg -	+50 µM DCCD	% Hemmung
DC1	DC1	0,14	0,13	7
DC1	A 1	0,10	0,09	10
A 1	DC1	0,10	0,025	75
A 1	A 1	0,12	0,03	75

DISKUSSION

Die ATP-Synthetase spielt im Energiestoffwechsel von E.coli eine entscheidende Rolle. Das Enzym ist beteiligt an der oxidativen Phosphorylierung, dem aktiven Transport von Metaboliten, der $NAD(P)^+$-Transhydrogenierung sowie der Zellbeweglichkeit. Untersuchungen über den Aufbau und die molekulare Wirkungsweise des Enzyms bedingen die Reinigung einer nativen ATP-Synthetase und die Rekonstitution der energieübertragenden Enzymaktivität.

1. Rekonstitution der ATP-abhängigen Energieübertragung

Die bisher beschriebenen Verfahren zur Rekonstitution von Proteoliposomen - Ultraschallbehandlung, Gelfiltration, Dialyse - sind für die ATP-Synthetase von E.coli ungeeignet. Durch Zugabe eines Überschusses an Phospholipid zur Enzympräparation erfolgt eine spontane Rekonstitution von Proteoliposomen. Ihre enzymatische Aktivität ist der nativer Membranvesikel vergleichbar. Ein großer Vorteil der Methode liegt in der Einfachheit und Schnelligkeit der Ausführung. Wie die Bildung der Proteoliposomen erfolgt , ist unklar.

Einen wesentlichen Einfluß auf die Rekonstitution hat das Verhältnis von Phospholipid zu Detergenz. Bei der Rekonstitution beträgt es 17:1 (Mol:Mol). Bei der Extraktion aus Membranvesikeln wird ein Verhältnis von ca. 1:1 benötigt, um die ATP-Synthetase aus der Membran zu lösen. Dies legt die Vermutung nahe, daß bei der Rekonstitution das Detergenz in einem Überschuß an Phospholipid ausverdünnt wird. Dafür spricht, daß die Löslichkeit des des Detergenzmonomers in Wasser gering ist und seine Verteilung zwischen Phospholipidvesikeln und Detergenzmicellen in der gleichen Größenordnung liegt. Ein zu kleines Verhältnis von Phospholipd zu Detergenz führt zu einer Auflösung der Vesikel und zur Bildung von Lipid/Detergenz-Micellen. Eine zu kleine Detergenzkonzentration führt zu Proteoliposomen mit verminderter enzymatischer Aktivität. Das stützt die Vorstellung, daß zum Einbau von

Proteinen die Phospholipid-Doppelschicht der Vesikel destabilisiert werden muß, z.B. durch Detergenz.

Bei Taurodesoxycholat- und Desoxycholat-Extrakten ist eine hohe Salzkonzentration erforderlich. Bei niedriger Salzkonzentration ist die enzymatische Aktivität der rekonstituierten Proteoliposomen wesentlich geringer. Das Salz muß der Enzympräparation zugegeben werden. Zugabe zum suspendierten Phospholipid oder Zugabe nach Vermischen von Phospholipid und Enzympräparation führt zu Proteoliposomen mit geringer enzymatischer Aktivität. Eine hohe Salzkonzentration führt bei der Rekonstitution von Aminoxid--Extrakten zu Proteoliposomen verminderter Aktivität. Diese Salzeffekte können nicht erklärt werden.

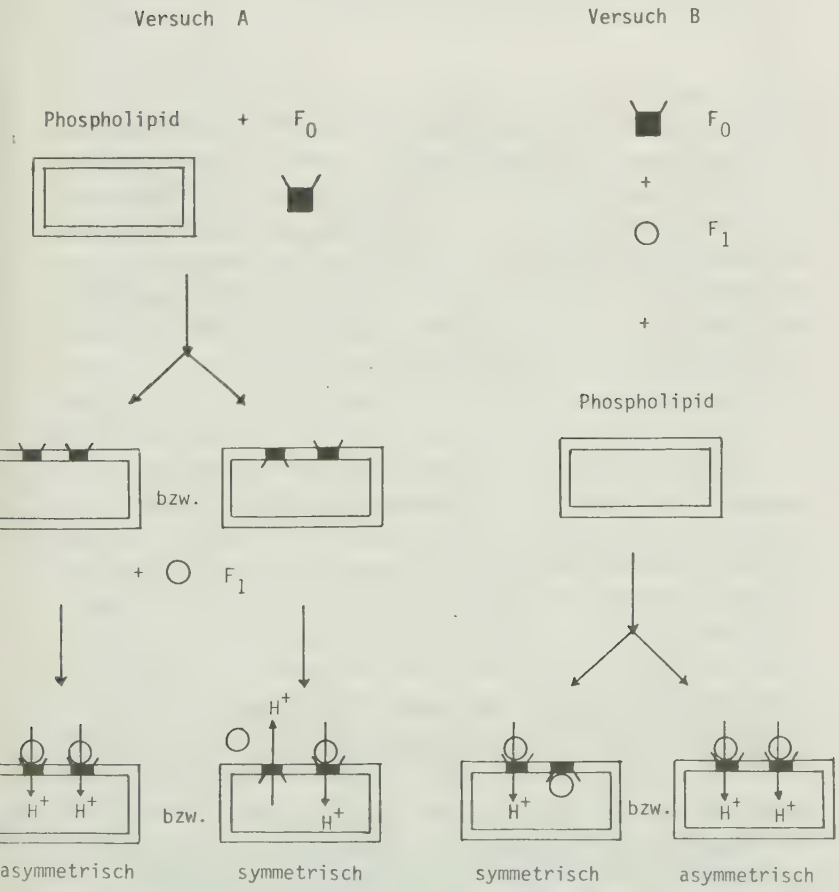
Die Symmetrie der Proteoliposomen wurde nicht näher untersucht. Da ihre Membran für ATP undurchlässig ist, wird durch die Zugabe von ATP zum Testansatz die für den Nettotransport von Protonen notwendige Asymmetrie geschaffen. Die Rekonstitutionsversuche mit getrenntem F_0 und F_1 liefern einen Hinweis für einen asymmetrischen Aufbau der Proteoliposomen. Wird F_1 erst nach der Rekonstitution der Proteoliposomen zugegeben - (F_0 + Phospholipid) + F_1 - , so zeigen die Proteoliposomen die gleiche Aktivität wie bei der Reihenfolge (F_1+ F_0) + Phospholipid (Abb.22). Bei einem symmetrischen Einbau von F_0 erwartet man aber im ersten Fall eine schwächere Aktivität, da ATPase-freies F_0 die Proteoliposomen entkoppelt (s. Titrationskurven Abb.8).

2. Messung der Energieübertragung durch den Fluoreszenztest

Beim ATP-$^{32}P_i$-Austausch und beim Fluoreszenztest wird die von der ATP-Synthetase geschaffene pmf gemessen. Für ihren Aufbau ist nicht allein die katalytische Aktivität des Enzyms entscheidend. Die ATP-Synthetase eines teilweise entkoppelten Vesikels besitzt zumindest die gleiche protonenpumpende Aktivität wie die eines nicht entkoppelten Vesikels, die geschaffene pmf und damit die meßbare energieübertragende Aktivität ist jedoch herabgesetzt. Zum Beispiel

Abb.22 Symmetrischer und asymmetrischer Einbau von F_0 in Phospholipidvesikel

A : zuerst werden F_0 und Phospholipid gemischt und erst nach der Rekonstitution von Proteoliposomen wird F_1 zugegeben
B : zuerst werden F_0 und F_1 gemischt und dann wird Phospholipid zugegeben



bestimmt in ATPase-freien Membranvesikeln bei unveränderter Atmungsaktivität die Menge an freiem F_0 den Grad der Atmungsabhängigen Energieübertragung (Altendorf et al., 1974).

Eine quantitative Auswertung der Fluoreszenzlöschung von Acridinfarbstoffen wurde von Schuldiner (1971) vorgenommen:

$$c_i = c_o \frac{Q}{V}$$

mit c_i = augenblickliche H^+-Konzentration im Vesikelinneren, c_o = die vor der Fluoreszenzlöschung vorliegende H^+-Konzentration im Vesikelinneren (= der des Mediums), V = inneres Vesikellumen als Bruchteil des Gesamtvolumens und Q = Bruchteil der bereits gelöschten Fluoreszenz. Mit dieser Beziehung kann ein quantitativer Zusammenhang zwischen Fluoreszenzlöschung und energieübertragender Enzymaktivität hergestellt werden. Die zeitliche Änderung der H^+-Konzentration im Vesikelinneren (dc_i/dt) ist dem Netto-Protonenfluß (p) ins Vesikelinnere proportional:

$$p = v \frac{dc_i}{dt} \qquad \text{mit } v = \text{absolutes inneres Volumen der Vesikel}$$

Setzt man $\frac{dc_i}{dt} = \frac{c_o}{V} \frac{dQ}{dt}$, so wird $p = c_o \frac{v}{V} \frac{dQ}{dt}$.

Da $\frac{v}{V} = V_0$, das Gesamtvolumen, ist, wird

$$p = c_o V_0 \frac{dQ}{dt}$$

Diese Gleichung besagt, daß der Netto-Protonenfluß proportional ist der Geschwindigkeit der Fluoreszenzlöschung.

Unter den gewählten Testbedingungen (Valinomycin/K^+) ist die pmf = ΔpH, und die Geschwindigkeit ihres Aufbaues ist proportional der Geschwindigkeit der Fluoreszenzlöschung. Der Netto-Protonenfluß setzt sich zusammen aus $p = p_i - p_a$ mit p_i = dem

durch das Enzym geschaffenen, nach innen gerichteten Protonenfluß und p_a = dem nach außen gerichteten Protonenfluß. p_a ist eine Funktion der Protonenleitfähigkeit der Membran und dem durch p geschaffenen ΔpH. Also ist zu Beginn der Reaktion p_a minimal und p der protonenpumpenden Enzymaktivität p_i am ähnlichsten. Eine Bestätigung dieser Überlegung ist der Nachweis,daß die Anfangsrate der Fluoreszenzlöschung durch E.coli Membranvesikel proportional ist der protonenpumpenden ATPase-Aktivität (Singh & Bragg, 1977).

3. Reinigung von F_0

Detergenz-Extrakte ATPase-freier Membranvesikel werden mit F_1 und Phospholipid zu Proteoliposomen rekonstituiert. Nur Proteo= liposomen von Taurodesoxycholat- und Desoxycholat-Extrakten zeigen energieübertragende Aktivität. Stabilitätstests zeigen, daß F_0 in den Taurodesoxycholat-Extrakten eine für die Reinigung ausreichende Stabilität besitzt. Die Reinigungsversuche bleiben jedoch erfolglos. So gelingt es nicht, das Protein z.B. im Glycerin-Gradienten oder an Phenyl-Sepharose zu fraktionieren oder das z.B. an Hydroxylapatit oder Agarose 0,5m fraktionierte Protein ist inaktiv. Eine mögliche Erklärung wäre, daß in den Extrakten größere Protein/Lipid/Detergenz-Aggregate vorliegen, durch deren Auftrennung F_0 inaktiviert wird. Bei der Reinigung des F_1F_0-Komplexes tritt diese Inaktivierung von F_0 nicht auf. Das legt zwei Vermutungen nahe: F_0 wird durch die Abspaltung von F_1 destabilisiert oder die Labilität von F_0 ist die Folge jener Protease-Aktivität, die bei der Reinigung des F_1F_0-Komplexes aus= geschaltet wird. Da auch die Abspaltbarkeit von F_1 eine mittelbare Folge der Protease-Aktivität ist, lassen sich die beiden Möglich= keiten nicht unterscheiden. Dazu muß die gereinigte ATP-Synthetase in F_1 und F_0 gespalten werden und die Stabilität von F_0 getestet werden.

Ein wichtiges Argument für die Reinigung der ATP-Synthetase von E.coli ist, daß die Enzyme von Wildtyp und Mutanten miteinander verglichen werden, um von den veränderten Strukturen auf deren Funktion zu schließen. In diesem Zusammenhang müssen F_0 oder die

Untereinheiten von F_0 gereinigt werden können. Die Reinigung des F_1F_0-Komplexes setzt eine feste Bindung von F_1 an F_0 voraus. Bei den Enzymen verschiedener Mutanten ist diese Bindung aber gestört. Eine Reinigung des Gesamtkomplexes ist damit in Frage gestellt. Einen Ausweg bietet die Reinigung von F_0 oder der Untereinheiten von F_0.

4. Reinigung der ATP-Synthetase

Die von Hare beschriebene Reinigung der ATP-Synthetase konnte nicht reproduziert werden; die Ursache dafür ist nicht bekannt.

Das Enzym wird durch eine Ammoniumsulfat-Fraktionierung von Desoxycholat-Extrakten ca. 3-4fach angereichert. Die Fällung ist technisch schwierig: das gefällte Material flotiert und die Ausbeute ist schlecht. Eine weitere Auftrennung soll durch Chromatographie an DEAE-Cellulose erreicht werden. Dabei stellt sich heraus, daß der Zusammenhalt zwischen F_1 und F_0 für die Reinigung der ATP-Synthetase eine entscheidende Rolle spielt. Bei der DEAE-Chromatographie bestimmt der Grad der Reinigung den Grad der Dissoziation des Enzyms.

Durch den Protease-Inhibitor p-Aminobenzamidin kann die Aufspaltung in F_1 und F_0 vermieden werden. Das negativ geladene Desoxycholat wird durch das zwitterionische Detergenz Aminoxid ersetzt, weil die Bindung von Desoxycholat an Proteine deren Ladungsunterschiede verwischt. Bei der Reinigung ist das Verhältnis von Aminoxid zu Methanol entscheidend. Das Enzym ist in 5mM Aminoxid/5% Methanol stabil, wird aber bei der Auftrennung des Extraktes auf DEAE--Sepharose inaktiviert. Durch Erhöhung der Methanolkonzentration auf 20% wird die Inaktivierung verhindert, es gelingt aber nicht mehr, das Protein zu fraktionieren. Bei einer Erhöhung der Amin=oxidkonzentration auf 25mM kann die ATP-Synthetase durch DEAE--Chromatographie ohne Aktivitätsverlust gereinigt werden. Bei

25mM Aminoxid und 20% Methanol ist das richtige Verhältnis zwischen Dissoziation von Aggregaten und der Stabilisierung der ATP-Synthetase gegeben.

Die für weitere Versuche notwendige Konzentrierung der ATP-Synthetase aus dem DEAE-Eluat erfolgt durch Sedimentation. Dabei wird das Enzym teilweise inaktiviert. Andere Konzentrierungsverfahren - Ammoniumsulfat-Fällung, PEG-Fällung, Ultrafiltration - inaktivieren das Enzym noch stärker.

5. Reinheit der ATP-Synthetase Präparation

Die Identifizierung der Untereinheiten ermöglicht, die Reinheit der ATP-Synthetase Präparation durch SDS-Gelelektrophorese festzustellen. Eine quantitative Auswertung der Densitogramme von SDS-Gelen zeigt, daß die Untereinheiten der ATP-Synthetase einen Anteil von ca. 80% an der Menge des angefärbten Proteins besitzen. Ca. 10-20% des angefärbten Proteins besitzen ein scheinbares Molekulargewicht von 66000. Die Bande kann ein Aggregat verschiedener Untereinheiten oder eine Verunreinigung darstellen. Die ATP-Synthetase wird mit F_1-Antikörpern aus nicht fraktionierten Aminoxid-Extrakten ausgefällt; im SDS-Gel des Immunpräzipitats treten die Untereinheiten der ATP-Synthetase auf, Protein mit einem Molekulargewicht von 66000 ist nicht vorhanden. Wahrscheinlich ist die Bande eine Verunreinigung, obwohl eine Aggregation von Untereinheiten im Laufe der Reinigung nicht ausgeschlossen werden kann.

Wie ist in der ATP-Synthetase Präparation das Verhältnis von F_1 zu F_0 ? Im nativen Enzym ist es 1:1; bei einem Verhältnis >1 liegt eine gemischte F_1/F_1F_0- Präparation vor. In einer gemischten F_1/F_1F_0-Präparation besitzt nur der F_1F_0-Anteil eine energieübertragende Aktivität, ist nur die ATPase-Aktivität des F_1F_0-Komplexes durch DCCD hemmbar und phospholipidabhängig.

Ändert sich im Laufe der Reinigung das Verhältnis von F_1 zu F_0 nicht, so nimmt die spezifische energieübertragende Aktivität ebenso zu wie die spezifische ATPase-Aktivität. Die ATPase-Aktivität wird von den Membranen aus 18fach angereichert, die energieübertragende Aktivität im Fluoreszenztest ca. 15fach. Unter der Voraussetzung, daß die ATPase-Aktivität von abgelöstem F_1 auf keinen Fall kleiner ist als im F_1F_0-Komplex (s. x), läßt sich der Anteil der ATP-Synthetase an der ATPase-Aktivität auf ca. 80% schätzen.

Bei verschiedenen ATPase-Komplexen - ATP-Synthetase des thermophilen Bakteriums PS3 (Sone et al.,1975), Ca^{2+}-ATPase des sarcoplasmatischen Reticulums (Dean & Tanford, 1978), Na^+/K^+-ATPase der cytoplasmatischen Zellmembran (Goodman et al., 1978) - führt eine weitgehende Delipidisierung ($< 0{,}2\mu$Mol Ⓟ /mg Protein) zu einem fast vollständigen Verlust der Aktivität. Durch Zugabe von Phospholipid kann die Ausgangsaktivität wiederhergestellt werden. Wird die E.coli ATP-Synthetase von Desoxycholat- bzw. Taurodesoxycholat-Extrakten delipidisiert, fällt die ATPase-Aktivität auf $<5\%$ ab. Zugabe von Phospholipid führt zu einer völligen Reaktivierung des Enzyms. Der Phospholipidgehalt des gereinigten Enzyms beträgt $0{,}1\mu$Mol Ⓟ /mg Protein, folglich sollte die durch F_1F_0 katalysierte ATP-Hydrolyse weitgehend gehemmt sein (s. xx) und die verbliebene ATPase-Aktivität der Präparation auf F_1 zurückzuführen sein. Reaktivierung von F_1F_0 durch Phospholipid zeigt, daß die von F_1 stammende ATPase-Aktivität ca. 20% der Gesamtaktivität stellt (s. Tab.11).

x wahrscheinlich ist die ATPase-Aktivität von abgelöstem F_1 größer als im F_1F_0-Komplex (vgl. Yoshida et al., 1975 mit Sone et al., 1975; u.s. Feinstein & Fisher, 1977).

xx von Dean & Tanford (1978) wird gezeigt, daß ein geeignetes Detergenz als Ersatz für Phospholipid eine delipidisierte, inaktivierte Ca-ATPase reaktivieren kann. Sollte Aminoxid bei der ATP-Synthetase ähnlich wirken, kann auch ein delipidisierter F_1F_0-Komplex ATPase-Aktivität besitzen.

Die Hemmbarkeit der ATP-Hydrolyse durch DCCD ist ebenfalls phospholipidabhängig. Die Restaktivität der Enzympräparation (ohne Phospholipid) ist nicht DCCD-hemmbar, die phospholipid= abhängige Aktivität (Aktivität mit Phospholipid minus Aktivität ohne Phospholipid) wird zu über 90% durch DCCD gehemmt.

Aus der Anreicherung der energieübertragenden Aktivität, aus der Stimulierbarkeit der ATPase-Aktivität durch Phospholipid sowie aus der DCCD-Hemmbarkeit der ATP-Hydrolyse kann man das Verhältnis von ATP-Synthetase zu ATPase auf ca. 5:1 schätzen.

6. Identifizierung der Untereinheiten

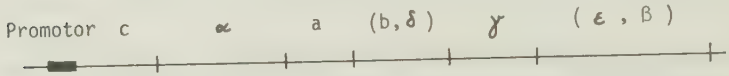
In der Mutante AM12 ist ein Mu-Phage in den unc-Genen integriert und ruft eine polare Mutation hervor. Als Folge dieser Mutation läßt sich in der Mutante kein F_1-antigenes Material mehr nachweisen. SDS-Gelelektrophorese von Membranextrakten des Wildtyps und der Mutante zeigt, daß im Extrakt der Mutante 7 Proteine fehlen. Ob die Proteine nicht mehr synthetisiert werden oder ob sie in Folge einer Veränderung - gestörter Zusammnebau des Komplexes, kein Einbau in die Membran o.ä. - auf der Membran nicht mehr nachzu= weisen sind, spielt für die Schlußfolgerung keine Rolle : da durch die Mutation eindeutig das unc-Genprodukt betroffen ist, darf man die Proteine als Untereinheiten der ATP-Synthetase be= trachten. 5 Proteine lassen sich eindeutig den Untereinheiten von F_1 zuordnen; zwei weitere gehören zum membranintegrierten Teil der ATP-Synthetase. Mit dem bereits bekannten DCCD-bindenden Protein besteht die ATP-Synthetase aus acht Untereinheiten mit den scheinbaren Molekulargewichten: α 56000, ß 52000, γ 32000, a 27000, δ 22000, b 19000, ε 13000 und c 8500.

7. Nachweis des DCCD-bindenden Proteins in der Mutante AM12

Der Einbau der Phagen DNA ins unc-Operon der Mutante AM12 führt zu einem Ausfall aller distal gelegenen Genprodukte des Operons. Die Mutante besitzt das DCCD-bindende Protein, während die übrigen Untereinheiten nicht nachgewiesen werden konnten. Mit Hilfe von λdunc Phagen, die verschieden lange Stücke des unc-Operons tragen,

Abb.23 Feinstruktur des unc-Gens

Bei den in Klammern gesetzten Zeichen ist die Reihenfolge der Abschnitte noch nicht eindeutig geklärt (v.Meyenburg, pers.Mitt.)



gelang es v.Meyenburg (pers. Mitt.), die in Abb.23 dargestellte Feinstruktur des unc-Gens aufzustellen. Die Mutation von AM12 kann erklärt werden durch einen Einbau der Phagen DNA in den für ∝ kodierenden Abschnitt oder durch einen Einbau ins distale Ende des für c kodierenden Abschnitts.

Die Kurierung der Mutante vom Mu-Phagen führt zur Mutante AS12/25. Sie zeigt einen uncA-Phänotyp (Schairer et al., 1976). Wenn in der Mutante AS12/25 ein funktionsfähiges Protein c vorliegt, dann auch in der Mutante AM12. Dies spricht für eine Integration der Phagen DNA in den für ∝ kodierenden Abschnitt (Abb.23).

Membranvesikel von AM12 zeigen nach Waschen mit Puffern niederer Ionenstärke keine Entkopplung der Atmungs-abhängigen Energieübertragung durch das DCCD-bindende Protein. Aus Chloroplasten (Nelson et al., 1977) und Mitochondrien (Criddle et al., 1977) wird mit organischen Lösungsmitteln das DCCD-bindende Protein extrahiert und mit Phospholipid zu Proteoliposomen rekonstituiert. Nach Einbau des Proteins ist die Protonenleitfähigkeit der Membran stark erhöht; bei Zugabe von DCCD bzw. Oligomycin tritt der Effekt nicht auf. Eine Auslegung der Versuche sagt, daß das DCCD-bindende Protein allein für eine physiologische Protonenleitung in der Membran ausreicht. Entsprechende Versuche mit dem DCCD-bindenden Protein von E.coli verlaufen unterschiedlich. Während von Altendorf (1977) eine erfolgreiche Rekonstitution berichtet wird,

Letzteres stimmt mit der oben geschilderten fehlenden Entkopplung von Membranvesikeln der Mutante AM12 überein. Offensichtlich ist in E.coli Membranvesikeln das DCCD-bindende Protein allein nicht in der Lage, die Energieübertragung als Protonenleiter zu ent= koppeln.

8. Mögliche Funktionen der verschiedenen Untereinheiten von F_0

Warum kann das isolierte DCCD-bindende Protein von Chloroplasten bzw. Mitochondrien als Protonenleiter wirken und das Protein von E.coli nicht ? Das DCCD-bindende Protein liegt im F_1F_0-Komplex als Oligomer vor (Kagawa et al., 1976; Sebald, 1977). Das legt die Vermutung nahe, daß nur das vollständige und aus intakten Einzelproteinen zusammengesetzte Oligomer als Protonenleiter wirken kann. Folglich kann die Protonenleitung mit dem isolierten DCCD-bindenden Protein nur rekonstituiert werden, wenn es als Oligomer gereinigt wurde oder wenn die Bildung des Oligomers in den Proteoliposomen ein stark kooperativer Prozess ist. Diese beiden Möglichkeiten können das positive Rekonstitutionsergebnis mit dem DCCD-bindenden Protein von Chloroplasten bzw. Mitochond= rien erklären. Das gereinigte Protein von E.coli liegt demnach als Monomer vor und kann in den Proteoliposomen kein vollständiges Oligomer bilden. Die Mutante AM12 würde dann zeigen, daß auch in-vivo das DCCD-bindende Protein allein kein protonenleitendes Oligomer bilden kann. Vielleicht wird dazu ein den Zusammenbau und -halt organisierendes Protein benötigt.

Ein hypothetisches Modell für die Funktionen der Untereinheiten von F_0 lautet : das DCCD-bindende Protein bewirkt als Oligomer die Protonenleitung (Nelson et al., 1977, Criddle et al., 1977), eine andere Untereinheit organisiert den Zusammenbau des Oligomers und stabilisiert seinen Zusammenhalt (bisher keine Evidenz), eine weitere Untereinheit bewirkt die Bindung von F_1 an F_0 (Sone et al., 1978).

Zusammenfassung

1. Die ATP-Synthetase wurde mit Detergenz aus der Membran gelöst und mit Phospholipid zu Proteoliposomen rekonstituiert. Die bisher beschriebenen Verfahren zur Rekonstitution von Proteoliposomen waren für die ATP-Synthetase von E.coli ungeeignet. Es wurde eine schnelle und einfache Methode zur Rekonstituion von Proteoliposomen ausgearbeitet. Die rekonstituierten Proteoliposomen zeigten die gleiche ATP-abhängige Energieübertragung wie die ursprünglichen Membranvesikel. Die durch die ATP-Synthetase katalysierte Energieübertragung konnte durch den ATP-$^{32}P_i$-Austausch und die Fluoreszenzlöschung von ACMA quantitativ bestimmt werden.

2. Aus ATPase-freien Membranvesikeln wurde F_0 extrahiert und mit F_1 und Phospholipid zu energieübertragenden Proteoliposomen rekonstituiert. Es gelang nicht, F_0 aus Membranextrakten zu reinigen.

3. Die ATP-Synthetase wurde mit Desoxycholat aus der Membran extrahiert. Eine Reinigung des Enzyms nach der Methode von Hare war nicht möglich. Das Enzym konnte durch Ammoniumsulfat-Fraktionierung angereichert werden. Eine weitere Reinigung durch Chromatographie an DEAE-Cellulose mißlang; bei der Chromatographie wurde F_1 vom F_1F_0-Komplex abgespalten.

4. Isolierung der Membranvesikel in Gegenwart des Proteaseinhibitors p-Aminobenzamidin verhindert die Abspaltung von F_1 nach Waschen der Vesikel mit Puffern niederer Ionenstärke. Die ATP-Synthetase wurde mit Aminoxid extrahiert und durch Chromatographie an DEAE-Sepharose gereinigt.

5. Membranextrakte des Wildtyps wurden in einer SDS-Gelelektrophorese mit Extrakten der polaren unc-Mutante AM12 verglichen. In den Membranextrakten der Mutante fehlen 7 Polypeptidketten mit den scheinbaren Molekulargewichten: α 56000, ß 52000, γ 32000, a 27000, δ 22000, b 19000, ε 13000. Da die Mutation von AM12

in den unc-Genen lag, konnten die Polypeptidketten als Untereinheiten der ATP-Synthetase identifiziert werden. Eine weitere bereits bekannte Untereinheit, das DCCD-bindende Protein c (Mol.gewicht 8500), war in der Mutante AM12 vorhanden.

6. In der ATP-Synthetase Präparation waren alle 8 Untereinheiten vorhanden. Sie besaßen einen Anteil von ca. 80% an der Menge des mit Coomassie Blau anfärbaren Proteins. Die gereinigte ATP-Synthetase konnte mit Phospholipid zu energieübertragenden Proteoliposomen rekonstituiert werden. Die durch das Enzym katalysierte ATP-Hydrolyse war phospholipidabhängig und DCCD-hemmbar.

7. Es wurde eine DCCD-resistente Mutante charakterisiert. Die Mutante hatte eine intakte ATP-Synthetase mit herabgesetzter Empfindlichkeit gegen DCCD. Die herabgesetzte Hemmbarkeit blieb auch nach Extraktion des Enzyms aus Membranvesikeln und nach Rekonstitution zu des extrahierten Enzyms zu Proteoliposomen erhalten. Die Mutation kartiert in den unc-Genen verändert den membranintegrierten Teil der ATP-Synthetase.

MATERIAL UND METHODEN

1. Abkürzungen

1.1. genetische Zeichen

suc	Fähigkeit, auf Succinat als einziger Kohlenstoffquelle zu wachsen
ilv, met, his	Auxotrophie für Isoleucin und Valin, Methionin, Histidin
unc	Defekt in der ATP-Synthetase

1.2. chemische Verbindungen, Coenzyme und Substrate

ACMA	9-Amino-6-chlor-2-methoxyacridin
AMP, ADP, ATP	Adenosinmono-, di- und triphosphat
AO	Acyl (C_{11}-C_{17}) amidopropyldimethylaminoxid
BL7	Acyl (C_{11}-C_{17}) amidopropyl-dimethylamino-essigsäure-Betain
CCCP	Carbonylcyanid-m-chlorophenylhydrazon
CM-...	Carboxymethyl-...
DCCD	N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid
DEAE-...	Diäthylaminoäthyl-...
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DOC	Desoxycholat, Na-Salz
DTE	Dithioerythrit
EDTA	Äthylendiamintetraacetat, Na-Salz
EGTA	Äthylenglykol-bis(2-amino-äthyläther) N,N'-tetra-essigsäure
LDO	Lauryldimethylamin-N-oxid
Mes	2-(N-Morpholino)äthansulfonsäure
MOPS	Morpholinopropansulfonsäure
NAD/NADH	oxidiertes/reduziertes Nicotinamidadenindinucleotidphosphat

P_i	Orthophosphat
PAB	p-Aminobenzamidin
PE	Phosphatidyläthanolamin
PEG	Polyäthylenglykol
PC	Phosphatidylcholin
PL	Phospholipid
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
pmf	proton-motive-force
psi	pound per square inch
S10/8	Decylpolyäthylenglykol-8-äther
SDS	Natrium-Dodecylsulfat
TCA	Trichloressigsäure
TDOC	Taurodesoxycholat, Na-Salz
TMED	N,N,N',N'-Tetramethylendiamin
Tris	Tris-Hydroxymethylaminomethan
TTFB	Trifluormethyl-tetrachlorbenzimidazol

1.3. Proteine und Enzyme

ADH	Alkoholdehydrogenase
BSA	Rinderserumalbumin
Cytc	Cytochrom c
F_1F_0	ATP-Synthetase
F_1	ATPase
F_0	Membranintegrierter Teil der ATP-Synthetase
STI	Sojabohnen-Trypsin-Inhibitor
α β γ δ ε	im SDS-Elektropherogramm sichtbare Untereinheiten der ATPase

1.4. sonstige Abkürzungen

E_x bzw. $O.D._x$	Extinktion bzw. optische Dichte bei x nm
F	Fluoreszenz in willkürlichen Einheiten

E bzw. mE

Einheit bzw. Millieinheit einer Enzymaktivität

Definition: Eine Einheit ist die Menge Enzym, die in einer Minute die Umwandlung von 1 µMol Substrat katalysiert.

E_{F1} fluoreszenzlöschende Enzymaktivität der ATP-Synthetase im ACMA-Fluoreszenztest

Definition: Eine fluoreszenzlöschende Einheit ist die Menge an ATP-Synthetase, die in einer Minute die Fluoreszenz um eine Einheit löscht (10.4.)

ONK Übernachtkultur

2. Bakterien- und Bakteriophagenstämme

Bezeichnung	genetische Konstitution	Herkunft
A1	K12 Y_{mel}, (λ), rha, fadR, but12, lacI	Schairer
AS12	A1, ilv, metE von A1 durch Integration von $MuC^{ts}62$ in unc abgeleitet	Schairer
AM12	A1, unc(Mu) von AS12 durch P_1-Transduktion abgeleitet	Friedl
AC12	A1, his(Mu) von R12 durch Integration von $MuC^{ts}62$ in his abgeleitet	Friedl
R12	A1 von AM12 durch P_1 Transduktion abgeleitet	Friedl
AM1	A1, his(Mu), von A1 durch Integration von $MuC^{ts}62$ in his abgeleitet	Friedl
DC1	A1 mit in unc kartierender DCCD-Resistenz	Schairer
P_1 kc		Pauli
$MuC^{ts}62$	hitzeinduzierbarer Mu	Kamp

3. Chemikalien und Enzyme

Soweit im Folgenden nicht anders vermerkt, sind sämtliche Chemikalien von Merck AG., Darmstadt, und sämtliche Enzyme, Coenzyme und Substrate von Boehringer & Söhne, Mannheim.

ACMA (Geschenk von Prof. Overath), AO (Goldschmidt, Essen), Agarose 0,5m (BioRad, München), Acrylamid und Bis-Methylen-acrylamid (Serva, Heidelberg), BL7 (Goldschmidt, Essen), BSA (Serva, Heidelberg), CCCP (Calbiochem., San Diego), Cholsäure (Serva, Heidelberg), DCCD (Fluka, Buchs), ^{14}C-DCCD (Cis, Frankfurt), DEAE-Cellulose (Whatman, Heidelberg), DEAE-Sepharose-CL-6B (Pharmacia, Upsala), Diallylweinsäurediamid (Serva, Heidelberg), Emulsifier (Packard, Zürich), Hydroxylapatit (Bio-Rad, München), Mes, Mops, Tris, Tricin (Sigma, München), PEG-6000, PMSF (Serva, Heidelberg), Phenyl-Sepharose (Pharmacia, Upsala), $^{32}P_i$ (Amersham-Buchler, Braunschweig), S10/8 (Geschenk von Dr.Stockburger), SDS (Serva, Heidelberg), Sephadex- und Sepharose-Gele (Pharmacia, Upsala), TDOC (Sigma, München).

4. Puffer

A : 50M Mops pH 7,0, 10mM Mg Cl_2, 175 mM KCl, 0,2 mM DTE, 0,2 mM EGTA

B : 20 mM Imidazol pH 7,0, 1 mM $MgCl_2$, 0,2 mM DTE, 0,2 mM EGTA, 10% Glycerin

C : 1 mM Tris-Cl, pH 8,0, 0,5 mM EDTA, 0,2 mM DTE, 10% Glycerin

D : 5 mM Tris-Cl pH 8,0, 10 mM $MgCl_2$, 0,2 mM DTE, 0,2 mM EGTA, 6 mM PAB, 0,1 mM PMSF, 10% Glycerin

E : 50 mM Tris-Cl pH 7,5, 1 mM $MgCl_2$, 0,2 mM DTE, 0,2 mM EGTA, 6 mM PAB, 0,1 mM PMSF, 5 mM Na-Cholat, 10% Glycerin

F : 50 mM Imidazol-Cl pH 7,0, 0,2 mM DTE, 20% Methanol

G : 20 mM Imidazol-Cl pH 7,0, 0,2 mM DTE, 0,2 mM EGTA, 1 mM $MgCl_2$, 8 mM TDOC

H : 50 mM Tris-Cl pH 7,5, 5 mM $MgCl_2$, 0,2 mM DTE, 0,2 mM EGTA, 10% Glycerin

I : 20 mM Tris-Cl pH 8,0, 0,1 mM DTE, 0,5 mM $MgCl_2$, 5 mM DOC

K : 50 mM Tris-Cl pH 7,5, 0,2 mM DTE, 0,2 mM EGTA, 1 mM $MgCl_2$, 8 mM DOC

L : 50 mM Tris-Cl pH 7,5, 0,2 mM DTE, 0,2 mM EGTA, 1 mM $MgCl_2$, 6 mM PAB

M : 5 mM Na-Citrat pH 6,0, 0,2 mM EGTA, 0,2 mM DTE, 0,2 mM $MgCl_2$, 12 mM TDOC

N : 10 mM Tris-Cl pH 8,0, 1 mM $MgCl_2$, 0,2 mM EGTA, 0,2 mM DTE, 0,5 mM ATP, 10% Methanol

O : 20 mM Imidazol-Cl pH 7,0 im Falle eines TDOC-Extraktes bzw. 50 mM Tris-Cl pH 7,5 im Falle eines DOC-Extraktes, 0,2 mM DTE, 0,2 mM EGTA, 10 mM $MgCl_2$, 100 mM KCl, 20% Glycerin und 8 mM DOC bzw. TDOC

P : 375 mM Tris-Cl pH 8,8, 0,2% SDS, 20% Sucrose, 1‰ TMED, 0,1‰ Ammoniumpersulfat

Q : 125 mM Tris-Cl pH 6,8, 0,2% SDS, 1‰ TMED, 0,1‰ Ammoniumpersulfat

R : 25 mM Tris - 20 mM Glycin pH 8,6, 0,2% SDS

S : 20 mM Tricin pH 8, 0,1 mM ATP, 0,2 mM DTE, 0,2 mM EGTA, 10% Methanol

T : 10 mM Tricin pH 8, 0,2 m NaCl, 0,2 mM DTE, 0,2 mM EGTA, 0,2% PE, 0,15% PC, 0,02% DOC, 10% Methanol

U : 20 mM Mes pH 6,3, 0,5 mM EDTA

V : 5 mM Tris, 5 mM Essigsäure, 0,2 mM DTE, EGTA, $MgCl_2$, 5 mM TD, mit NaOH auf den angegebenen pH eingestellt

5. Medien und Anzucht der Bakterienstämme

a) Nährlösungen

TYP: in 1 l H_2O 10g Trypton, 5g Pepton, 5g Yeast-Extract, 5g NaCl; nach dem Autoklavieren werden 10 ml 40%ige Glucose zugesetzt.

Ca-TYP: TYP mit 2,5 x 10^{-3} M $CaCl_2$

Vogel-Bonner Medium (VB)

in 1 l H_2O 20 ml VB-Konzentrat, 1 ml Spurenelemente; nach dem Autoklavieren wird die Kohlenstoffquelle zugegeben.

VB-Konzentrat:

in 670 ml H_2O 10g $MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$, 100g Citronensäure $\cdot\ H_2O$, 500g K_2HPO_4, 175g $NaNH_4HPO_4 \cdot 4\ H_2O$, 1 ml Chloroform

Spurenelemente für VB:

in 1 l H_2O 230 mg $CoSO_4 \cdot 7\ H_2O$, 290 mg H_3BO_3, 750 mg $(NH_4)_6 Mo_7O_{24} \cdot 4\ H_2O$, 800 mg $FeCl_3 \cdot 6\ H_2O$, 380 mg $MnSO_4 \cdot H_2O$, 500 mg $CuSO_4 \cdot 5\ H_2O$, 4200 mg $ZnSO_4 \cdot 7\ H_2O$, 1 ml Chloroform.

Kohlenstoffquellen:

Glycerin 0,4%, Glucose 1%, Succinat 1%

Aminosäuren:

Isoleucin, Valin, Methionin je 100 µg/ml

b) Nährböden

P1-Platten (Lennox, 1955):

in 1 l H_2O 10g Trypton, 5g Yeast-Extract, 7,5g NaCl, 10g Agar; nach dem Autoklavieren werden 2,5 ml 40%ige Glucose und 2,5 ml 1 M $CaCl_2$ zugefügt; Platten direkt am nächsten Tag benutzen.

P1-Weichagar:

Rezept wie für P1-Platten, aber nur 6g Agar/l

VB-Platten:

20 ml VB-Konzentrat, 1 ml Spurenelemente in 200 ml H_2O, 15g Agar in 800 ml H_2O; erst nach Autoklavieren vereinigen und Kohlenstoffquelle zufügen.

c) Anzucht der Bakterienstämme

Die Stämme werden bei starker Belüftung und konstantem pH angezogen und in der spätlogarithmischen Phase abgeerntet.

6. P1-Lysate und P1-Transduktionen (Lennox, 1955)

a) Herstellung von P1-Lysaten

10^9 Zellen einer frischen, in TYP gewachsenen Übernachtkultur (ÜNK) werden mit 5 x 10^6 Phagen in 2,5 ml P1-Weichagar (45°C, Wasserbad) gemischt und sofort auf eine frische P1-Platte gegossen, die bei 37°C inkubiert wird. Ist nach 5-6 Stunden konfluente Lyse erreicht, wird der Weichagar abgegossen oder mit einem sterilen Spatel abgekratzt. Jede Platte wird mit 2 ml TYP nachgewaschen und dies mit dem Weichagar in einem Zentrifugenglas vereinigt. Es werden 5 ml Chloroform zugegeben und möglichst gut mit einer Pipette durchgemischt. Anschließend wird 10 min bei 5.000 rpm in einer Christ-Tischzentrifuge zentrifugiert und der klare Überstand über Chloroform im Kühlschrank aufbewahrt.

b) Titration der P1-Lysate

Von dem P1-Lysat werden 0,1 ml der 10^{-6}, 10^{-7} und 10^{-8}-Verdünnung mit 10^9 Zellen einer frischen, in TYP gewachsenen ÜNK von Indikatorbakterien in 2,5 ml P1-Weichagar gemischt und dann möglichst quantitativ auf P1-Platten ausgegossen. Die Platten werden bei 37°C inkubiert und die Plaques ausgezählt.

c) P1-Transduktion

1 ml einer frischen, in TYP gewachsenen ÜNK des Rezipienten wird in einer Tischzentrifuge abzentrifugiert und die Bakterien in 1 ml Ca-TYP wieder aufgenommen. Es werden 1-2 x 10^9 Phagen zugegeben (Multiplizität ca. 1) und das Gemisch 20 min bei 37°C inkubiert. Dann werden 5 ml VB zugegeben, die Bakterien abzentrifugiert und inmal mit 5 ml VB gewaschen. Nach Aufnahme der Bakterien in 1 ml VB werden davon eine 1 : 10 und 1 : 100 Verdünnung in VB hergestellt und von allen Suspensionen je 0,1 ml auf selektive VB-Platten ausgespatelt.

7. Mu-Lysate und Induktion von Mutationen durch Mu

Eine frische ÜNK eines Mu-lysogenen Stammes wird auf ca. 5 x 10^7 Zellen /ml in TYP-Medium verdünnt. Die Kultur wird bei 32°C gut belüftet. Bei einem Zelltiter von ca. 1,5 x 10^8 Zellen /ml ($O.D._{420}$ 0,6 = ca. 2 x 10^8 Zellen /ml) wird die Temperatur für 15 min auf 43°C erhöht und danach auf 37°C eingestellt. Ca. 1 Stunde nach Induktion des Phagen setzt die Lyse ein, bei der innerhalb von 30 min 80-90% der Zellen lysieren. Aus dem Lysat werden ganze Zellen und Zelltrümmer 5 min mit 4.000 upm (Christ Tischzentrifuge) abzentrifugiert. Der Oberstand wird mit ein paar Tropfen Chloroform leicht geschüttelt und 15 min bei Zimmertemperatur stehengelassen.

Eine frische ÜNK des zu mutagenisierenden Stammes wird auf ca. 6 x 10^6 Zellen /ml und das Lysat 1 : 50 in TYP-Medium verdünnt. Je 5 ml beider Verdünnungen werden miteinander vermischt und 1 Stunde ohne Schütteln bei 32°C inkubiert. Über Nacht wird bei 32°C eine Kultur des Ansatzes hochgezogen und zur Penicillin-Selektion verwandt.

8. Penicillin-Selektion

Aus 5 ml einer frischen ÜNK werden die Zellen abzentrifugiert und zweimal mit je 5 ml VB-Medium gewaschen. Nach Resuspension in 5 ml VB-Medium werden die Zellen 3 Stunden bei 32°C geschüttelt. Die Kultur wird auf 2 x 10^7 Zellen /ml in VB-Glucose-Medium verdünnt, mit 2.000 E/ml Penicillin versetzt und weiter bei 32°C geschüttelt. Als Kontrolle dient ein Kölbchen ohne Penicillin. Ist die Trübung in der Kontrolle um das 10fache gestiegen, werden 4 µg/ml Penicillinase zu der Kultur mit Penicillin gegeben und weitere 20 min inkubiert. Es werden je 0,1 ml des Ansatzes auf VB-Glucose Platten ausgespatelt, die die gewünschten Aminosäuren enthalten. Nach 48h Inkubation bei 32°C

werden die herangewachsenen Kolonien auf Platten ohne die Aminosäure gestempelt. Durch Vergleich entsprechender Platten ermittelt man die gewünschten Mutanten.

9. Proteinbestimmung

9.1. nach Lowry (1951)

In je 1 ml H_2O werden verschiedene Mengen einer BSA-Standard-Lösung (2 mg/ml) bzw. einer geeigneten Verdünnung der zu bestimmenden Probe gegeben. Es wird je 0,1 ml 3 M TCA zugefügt und der Ansatz 5 min im Eisbad gehalten. Das ausgefallene Protein wird 10 min mit 5.000 upm (Christ-Tischzentrifuge) abzentrifugiert, der Überstand abgegossen, das Sediment in 3 ml (2% Na_2CO_3, 0,1 M NaOH, 0,01% $CuSO_4$, 0,02% K-Tartrat) Lösung aufgenommen und 15 min bei Zimmertemperatur stehengelassen. Nach Zugabe von 0,3 ml 50% Folin-Reagenz wird nochmals 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Extinktion der Lösung bei 650 nm wird gegen einen Ansatz ohne Protein bestimmt. Der Proteingehalt der Probe wird durch Bezug auf den BSA-Standard ermittelt.

9.2. Abwandlung zur schnelleren Bestimmung

BSA-Standard bzw. Probe werden in 1 ml 0,5 mM DOC-Lösung gegeben und mit 0,1 ml 3 M TCA gefällt. Das nach der Zentrifugation verbleibende Sediment wird in 2 ml (0,008% $CuSO_4$, 0,025% K-Tartrat, 1,25% Na_2CO_3, 0,1 M NaOH, 1,25% SDS)-Lösung aufgenommen und 1 min bei 100°C inkubiert. Nach Zugabe von 0,2 ml 50% Folin-Lösung wird nochmals 1 min bei 100°C inkubiert und die Extinktion bei 650 nm gegen einen Leerwert gemessen.

10. Bestimmung der Enzymaktivitäten

10.1. Mg-ATPase

1 ml Testansatz enthält 50 mM Tris-Cl pH 7,8, 2 mM $MgCl_2$, 50 mM KCl, 0,4 mM NADH, 2 mM Phosphoenolpyruvat, 480 mE Pyruvatkinase und 300 mE Lactatdehydrogenase, 2 mM KCN sowie eine geeignete Menge der Probe. Die Reaktion wird durch Zugabe von 4 mM ATP gestartet und die ATPase-Aktivität durch die Abnahme der Extinktion bei 340 nm mit einem Gilford-240-Spektrophotometer bestimmt.. Die Testtemperatur beträgt 28°C.

10.2. $NAD(P)^+$-Transhydrogenase

Der Testansatz enthält 50 mM Tris-Acetat pH 7,5, 10 mM $MgCl_2$, 130 mM Äthanol, 6 mM Hydraziniumdichlorid, 2,5 µM NADH, 4 E/ml ADH und 2 mM KCN. Zu 1 ml Puffer werden 10-50 µg Membranprotein gegeben und die Reaktion durch Zugabe von 6 µM NADP gestartet. Bei Messung der ATP-getriebenen Reaktion wird vorher 5 mM ATP zugegeben. Die Transhydrogenase-Aktivität wird durch Zunahme der Extinktion bei 340 nm mit einem Aminco DW 2A Spectrophotometer bestimmt. Die Testtemerpatur beträgt 28°C.

10.3. ATP-$^{32}P_i$-Austausch

Eine geeignete Menge Probe (max. 10 µl) wird in ein Eppendorfgefäß zu 200 µl Testpuffer (10 mM Mes pH 6,5, 5 mM $MgCl_2$, 100 mM KCl, 0,25 mM Kalium (^{32}P)-Phosphat, 15 Ci/Mol) gegeben. Der Ansatz wird 10 min bei 25°C inkubiert. Die Reaktion wird durch Zugabe von 2,5 mM ATP gestartet. Nach 1, 6, 11 und 16 min werden je 50 µl des Ansatzes zu 5 µl 1,5 M $HClO_4$ pipettiert und 5 min auf Eis gestellt. Der Niederschlag wird 4 min mit 11.000xg abzentrifugiert. Vom Überstand werden 10 µl auf einen vorbehandelten Aktivkohlefilter gegeben. Nach viermaligem Waschen mit je 5 ml Puffer (250 mM Kaliumphosphat, 50 mM Natriumpyrophosphat, pH 2) wird die an den Filter gebundene Radioaktivität in einem Flüssigkeits-Szintillationszähler bestimmt.

Die Aktivkohlefilter (Binzer, Hatzfeld) wurden vorbehandelt: nach 15 min Einweichen der Filter in Puffer (500 mM Kaliumphosphat, 100 mM Natriumpyrophosphat, pH 7) wird die Flüssigkeit abgegossen und die Filter bei 60°C bis zum Testbeginn trockengehalten.

Die Austauschreaktion ist bei ca. 5 µg Membranprotein (spezifische ATPase-Aktivität ca. 0,6 E/mg) bis zu 30 min linear. Die Herabsetzung der Phosphatkonzentration führte dazu, daß die gemessenen Austauschaktivitäten niedriger liegen als die zuvor beschriebenen (Schairer et al., 1976).

10.4. Fluoreszenz-Test der Energieübertragung

a) qualitative Bestimmung

Der Testpuffer enthält 25 mM Mes pH 6,5, 10 mM $MgCl_2$ und 300 mM KCl. Zu 1 ml Puffer werden 100 µg Membranprotein bzw. 50 µl Proteoliposomen-Suspension gegeben und der Ansatz 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Fluoreszenz des Ansatzes (Anregung 410 nm, Abstrahlung 490 nm) wird mit der Nullpunktsunterdrückung des Gerätes (Aminco-Bowman-Fluorometer) auf Null geeicht und nach Zugabevon 2 µM ACMA geeignet verstärkt. Der so erhaltene Fluoreszenzwert wird willkürlich als 100% der Fluoreszenz bzw. 1 Fluoreszenzeinheit bezeichnet. Die Reaktion wird durch Zugabe von 5 mM ATP oder 4 mM Lactat gestartet; findet keine weitere Zunahme der Fluoreszenzlöschung mehr statt, wird die Reaktion mit 5 µg TTFB entkoppelt.

b) quantitative Bestimmung

Der Testpuffer enthält 25 mM Mops pH 7,3, 10 mM $MgCl_2$ und 300 mM KCl. Zu 1 ml Puffer werden 1 - 5 µg Protein (max. Vol 50 µl) ge-

geben. Beim Test von Membranvesikeln enthält der Puffer 5 µM Valinomycin, im Falle von Proteoliposomen 0,25 nMol pro µl eingesetzter Proteoliposomen-Suspension. Inkubation der Probe, Eichung der Fluoreszenz und Start der Reaktion erfolgen wie oben beschrieben. Der Test wird jedoch abgebrochen, sobald die Anfangsschwierigkeit der Fluoreszenzlöschung nicht mehr linear ist. Als Kontrolle dient ein Ansatz mit 10 µM TTFB.

Zur Auswertung des Tests wird die nur anfangs lineare Geschwindigkeit der Fluoreszenzlöschung auf 1 min extrapoliert und die Abnahme der Fluoreszenzeinheiten pro Minute und mg eingesetztes Protein angegeben: E_{F1}/mg.

10.5. Hemmung ATP-abhängiger Reaktionen mit DCCD

Membranproteine werden auf 1 mg/ml in 50 mM Tris-Cl pH 8, 10 mM $MgCl_2$ verdünnt und die angegebenen Mengen an DCCD als methanolische Lösung zugefügt (max. Endkonzentration 2% Methanol). Nach einer Inkubation bei 30°C von angegebener Dauer (meistens 30 min) wird die enzymatische Aktivität getestet.

Im Falle von Membranextrakten enthält der Inkubationspuffer zusätzlich eine angegebene Menge an Detergenz. Die Inhibition mit DCCD sollte vor Zugabe des Phospholipids erfolgen. Anderenfalls kommt es zu einer Verdünnung des DCCD in der Lipidphase, so daß unter den gegebenen Bedingungen keine Inhibition mehr festzustellen ist.

11. Membranisolierung

11.1. Herstellung ATPase-freier Membranen

Zellen werden in 3 ml Puffer A pro g Naßgewicht resuspendiert. Die Zellen werden mit einem Ribi-Cell-Fraktionator bei 18.000 psi und 10°-15°C aufgeschlossen und die Suspension mit 1 E DNase pro g

Zellnaßgewicht versetzt und kurz gerührt. Ganze Zellen und größere Zelltrümmer werden 10 min mit 12.000xg abzentrifugiert. Aus dem Überstand werden die Membranen 2 Stunden mit 160.000xg abzentrifugiert. Sollen die Membranen zur Herstellung von DOC-Extrakten verwandt werden, so werden sie in Puffer B aufgenommen. Zur Herstellung ATPase-freier Membranen wird das Sediment in 2 ml Puffer C pro g-Zellnaßgewicht aufgenommen, 20 min bei $0^{o}C$ inkubiert und rezentrifugiert. Die Membranen werden erneut gewaschen und in Puffer B resuspendiert. Der nach dem zweiten Waschen der Membranen anfallende Überstand enthält 50-80% der ursprünglich vorhandenen ATPase-Aktivität und wird zur Anreicherung der ATPase verwandt.

11.2. Membranen zur Extraktion der ATP-Synthetase mit AO bzw. BL7

Zunächst wird unter Einschluß von 6 mM PAB und 0,1 mM PMSF in Puffer A wie oben beschrieben verfahren. Zum Waschen der Membranen wird Puffer D verwandt. Nach dem zweiten Waschen werden die Membranen in Puffer E aufgenommen, auf 5 mg Protein /ml verdünnt und 20 min auf Eis inkubiert. Die Membranen werden rezentrifugiert und in Puffer B (6 mM PAB, 0,1 mM PMSF) resuspendiert.

11.3. Membranen zur Identifizierung der Untereinheiten der ATP-Synthetase

Von logarithmisch wachsenden Zellen werden nach der Methode von Osborne (1972) Sphäroblasten hergestellt. Bei einer $O.D._{420\ nm}$ von 1 - 1,5 werden die Kulturen schnell auf Eis abgekühlt und die Zellen 5 min mit 10.000xg abzentrifugiert. Nach Resuspension in kaltem Puffer (0,75 M Sucrose, 10 mM Tris-Cl pH 7,8) wird die $O.D._{420\ nm}$ der Suspension auf ca. 20 eingestellt. Es wird 100 µg Lysozym pro ml Suspension zugegeben und ca. 2 min auf Eis inkubiert. Während vorsichtigen Rührens wird dann über einen Zeitraum von ca. 10 min das doppelte Volumen kalter (1,5 mM Na-EDTA, pH 7,5) Lösung zugegeben. Unter einem Mikroskop ist zu erkennen,

daß ca. 80-90% der Zellen in Sphäroblasten umgewandelt wurden. Die Suspension wird mit 6mM PAB und 0,1mM PMSF versetzt und bei 10°-15°C mit 10000 psi durch einen Ribi-Cell-Fraktionator gepreßt. Die weitere Aufarbeitung erfolgt wie in 4.11.2 beschrieben.

12. Anreicherung der ATPase (Vogel & Steinhart,1975)

Die ATPase wird von der Membran abgelöst (4.11.1). Der Ansatz wird auf 50mM Tris-Cl pH8 und 20% Methanol (v/v) eingestellt. Nach Zugabe von 20mM $MgCl_2$ wird der Ansatz 10 min auf Eis gerührt und der Niederschlag 15 min bei 16000xg abzentrifugiert. Der Überstand wird abgenommen und mit 10%(w/v) PEG 6000 versetzt. Nach 20 min Rühren auf Eis wird der Niederschlag 15 min bei 16000xg abzentrifugiert , der Überstand verworfen und die Zentri= fugenbecher sorgfältig trockengewischt. Das Sediment wird in 0,25ml Puffer F pro g Zellnaßgewicht aufgenommen. Es wird 20mM $MgCl_2$ zu= gefügt und der Niederschlag 10 min mit 50000xg abzentrifugiert. Der Überstand wird abgenommen, mit 10%(w/v) PEG 1500 versetzt, 20 min auf Eis gerührt und der Niederschlag 10 min mit 50000xg abzentrifugiert. Der Überstand wird verworfen, die Zentrifugen= becher trockengewischt und das Sediment in 5 ml Puffer F resuspen= diert. Die Enzymlösung wird auf eine mit dem gleichen Puffer äquilibrierte Sepharose-6B Säule (2,5x100cm) aufgetragen. Das Protein wird mit einer Flußrate von ca. 20ml/h eluiert und in 5 ml Fraktionen gesammelt. Fraktionen mit ATPase-Aktivität werden vereinigt, das Enzym mit PEG 6000 gefällt (s.o.) und in 4 ml Puffer F aufgenommen. Aus 200g Zellen (Naßgewicht) erhält man 1500-2000 E ATPase mit einer spezifischen Aktivität von 30-40 E/mg.

13. Extraktion von F_0 aus ATPase-freien Membranvesikeln

ATPase-freie Membranvesikel werden auf 6 mg Protein/ml in Puffer G (600mM KCl, 12mM TDOC) verdünnt und 20 min auf Eis gerührt. Der Ansatz wird 1^h mit 200000xg zentrifugiert , der Überstand abge= nommen und über eine mit Puffer G äquilibrierte Sephadex-G 50 Säule (3x Vol. d. Probe) entsalzt. Der entsalzte Extrakt wird durch Ultrafiltration (Amincon Zelle, XM 50 Membran) auf 4-8mg

Protein/ml konzentriert.

14. Extraktion der ATP-Synthetase aus Membranvesikeln

14.1 Abgeändertes Verfahren nach Hare (1975)

Membranvesikel werden in Puffer I (900mM KCl) auf 8mg/ml verdünnt und 1^h bei 15^oC gerührt. Der Ansatz wird 1 Stunde bei 160000xg zentrifugiert und der Überstand abgenommen.
Nachdem das Testsystem für die energieübertragende ATP-Synthetase ausgearbeitet worden war, wurde die Extraktion abgeändert: Protein= konzentration 6mg/ml, Puffer K (600mM KCl) und die Temperatur während der Extraktion 0^oC. Damit wurden die Ausbeuten erhöht und die Stabilität der Präparation verbessert.

14.2 Extraktion mit Taurodesoxycholat

Extraktion wie in 14.1 nur mit Puffer G (600mM KCl).

14.3. Extraktion mit Betain bzw. Aminoxid

Membranvesikel werden in Puffer L (10mM AO bzw. 6mM BL7) auf 10mg Protein / ml verdünnt und 20 min auf Eis gerührt. Der Ansatz wird 1^h bei 200000xg zentrifugiert und der Überstand abgenommen.

15. Rekonstitution von Proteoliposomen

15.1 Rekonstitution durch Dialyse (Kagawa & Racker, 1971)

6mg PE und 4mg PC werden mit 1,5ml Puffer S (2% Cholat) 5 min unter Stickstoff durch Ultraschall suspendiert (Branson Sonifier, 40 W Ausgangsleistung). 1,5ml des DOC-Extraktes werden mit der Phospholipid-Suspension vermischt und 3 Stunden bei 4^oC gegen das 60fache Volumen Puffer S dialysiert. Nach einem Pufferwechsel (60x Vol.) wird weitere 5 Stunden dialysiert, erneut der Puffer (120x Vol.) gewechselt und 10 Stunden dialysiert. Die Suspension wird 1 Stunde bei 160000xg zentrifugiert und das Sediment in 0,5ml Puffer B aufgenommen.

15.2 Rekonstitution durch Gelfiltration (Kagawa & Racker, 1971)

6mg PE und 4mg PC werden in 0,2ml Puffer S (2% Cholat) 5 min unter Stickstoff durch Ultraschall suspendiert (s.o.). 1ml DOC--Extrakt wird mit der Phospholipid-Suspension vermischt und auf eine mit Puffer R äquilibrierte Sephadex-G 100 Säule (1x16cm) aufgetragen. Die Proteoliposomen werden mit dem Leervolumen der Säule eluiert; die Flußrate beträgt 2,5ml/h, die Rekonstitution wird bei $0^{o}C$ ausgeführt. Die Fraktionen mit Proteoliposomen werden vereinigt und 1 Stunde bei 160000xg zentrifugiert. Das Sediment wird in 0,5ml Puffer B aufgenommen.

15.3 Rekonstitution durch Ultraschallbehandlung (Racker & Eytan,1973)

6mg PE und 4mg PC werden mit 0,2ml DOC-Extrakt und 0,8ml H_2O unter Stickstoff durch Ultraschallbehandlung (Branson Sonifier, 20 W, 2min) suspendiert.

15.4 Rekonstitution von Proteoliposomen durch ein einfaches Verfahren (Friedl et al., 1977)

24mg PE und 16mg PC bzw. 40mg Asolectin werden mit 1 ml Puffer U auf Eis 20 min unter Stickstoff durch Ultraschall suspendiert (Branson Sonifier, 40 W). 100µl der Phospholipid-Suspension wer= den zu 50µl eines Ansatzes gegeben, der eine geeignete Menge Probe (max.50µg Prot.) enthält. Nach Zugabe des Phospholipids wird die Suspension 15 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Im Falle von TDOC- bzw. DOC-Aufarbeitungen enthält der Ansatz 6mM der Gallensäure, 2mM $MgCl_2$ und 1 M KCl. Bei Aminoxid- bzw. Betain--Präparationen beträgt die Detergenzkonzentration 6 - 12 mM, die $MgCl_2$ Konzentration 2mM, KCl entfällt. Wird eine Probe verwandt, die ein anderes Detergenz als TDOC, DOC, AO oder BL7 enthält, wird die Konzentration des Detergenz auf $\leq$ 1mM gehalten und dem Ansatz wird 240nMol TDOC, 1 M KCl sowie 2mM $MgCl_2$ zugefügt.

16. Auftrennung des Extraktes ATPase-freier Membranvesikel

16.1 Stabilitätstest

Ein entsalzter Extrakt ATPase-freier Membranvesikel wird über einen Amincon XM 50 Membranfilter auf eine Proteinkonzentration von 10mg/ml konzentriert. Je 50µl des konzentrierten Extraktes werden 1:20 verdünnt in :

Puffer V pH5, pH5,5, pH5,9, pH6,5, pH7,0, pH7,5, pH8,0, pH8,5, pH9,1

Puffer M pH4,0, pH4,6, pH4,9, pH5,3, pH5,6, pH6,0, pH6,3, pH6,7, pH 7,0

Puffer G ohne Zusatz, mit 10% Methanol, mit 20%(w/v) Glycerin, mit 175mM KCl, mit 200mM $NaClO_4$

Nach drei Tagen Inkubation bei 0^oC werden die Proben auf pH6,5 eingestellt und zu Proteoliposomen rekonstituiert.

16.2 Zentrifugation im Glyceringradienten

0,5ml eines Extraktes werden auf 11ml eines 10-30%(w/v) Glycerin-gradienten (Puffer G) aufgetragen und 14^h mit 30000upm in einem Beckman SW 41 Rotor zentrifugiert. Durch Austropfen werden 0,75ml fassende Fraktionen gebildet. Der Proteingehalt wird durch die E_{280} bestimmt. Aliquots einzelner Fraktionen werden vereinigt und über einen CF-25 A Membrankegel (Amincon) konzentriert.

16.3 Gelfiltration auf Agarose 0,5m

2ml eines TDOC-Extraktes (15mg Protein) werden auf eine mit Puffer G äquilibrierte Agarose 0,5m Säule (1,5x100cm) aufgetragen und das Protein mit einer Flußrate von ca. 10ml/h eluiert. Der Proteimgehalt wird durch E_{280} bestimmt. Aliquots einzelner Fraktionen werden vereinigt und konzentriert (s.o.).

16.4 Chromatographie an Carboxymethyl-Cellulose

10ml eines Extraktes (10mg Protein) in Puffer M werden auf eine mit dem gleichen Puffer äquilibrierte Säule CM-Cellulose (3ml Vol.) aufgepumpt. Es wird mit 5ml Puffer M eluiert.

16.5 Adsorption an Hydroxylapatit

0,5ml eines Extraktes (4mg Protein) werden mit 0,5 g Hydroxyl= apatit 10min auf Eis gerührt. Das Hydroxylapatit wird 1 min bei 11000xg abzentrifugiert, einmal mit demgleichen Volumen Puffer G und dann zweimal mit dem gleichen Volumen Puffer G (500mM P_i) gewaschen.

16.6 Chromatographie auf Phenyl-Sepharose

0,5ml eines Extraktes (5mg Protein) werden auf 1mg Protein/ml in Puffer B verdünnt (Endkonzentration des TDOC 2mM) und auf eine Phenyl-Sepharose Säule (2ml Vol.) aufgepumpt. Die Säule wird mit 2ml Puffer B gewaschen und das Protein mit 4ml Puffer G eluiert.

Alle Vorgänge finden bei $4^{o}C$ statt.

17. Ammoniumsulfat-Fällung

Der Extrakt wird auf Eis gerührt und tropfenweise mit bei $0^{o}C$ gesättigter Ammoniumsulfat-Lösung (0,5mM EGTA) versetzt. Wenn der angegebene Grad an Sättigung erreicht ist, wird der Ansatz 20 min auf Eis gerührt und der Niederschlag 15 min bei 50000xg abzentri= fugiert. Der Überstand wird abgenommen und weiter mit Ammonium= sulfat versetzt. Die Zentrifugenbecher werden sorgfältig trocken= gewischt und das Sediment in Puffer N (2mM DOC) aufgenommen.

18. Fällung mit PEG 6000

Der Extrakt wird auf 1-2mg Protein/ ml in Puffer O verdünnt und auf Eis gerührt. Durch tropfenweise Zugabe einer 50%(w/v) PEG 6000 Lösung wird die angegebene PEG-Konzentration eingestellt und der Ansatz 20 min auf Eis gerührt. Der Niederschlag wird 30 min bei

50000xg abzentrifugiert. Der Überstand wird abgenommen und weiter mit PEG 6000 versetzt. Die Zentrifugenbecher werden sorgfältig trockengewischt und das Sediment in Puffer O aufgenommen.

19. DEAE-Chromatographie von Desoxycholat-Extrakten

0,5ml einer über Sephadex-G 25 entsalzten Probe (4mg Protein, 5 E ATPase) werden auf eine mit Puffer I (5% Methanol) äquilibrierte DE-52 Cellulose Säule (3,5ml Vol.) aufgetragen. Die Säule wird mit 18ml Puffer I (5% Methanol,100mM KCl) gewaschen. Das Protein wird entweder mit 7ml Puffer I (5% Methanol, 400mM KCl) oder mit einem linearen KCl-Gradienten eluiert - 70ml Puffer I (5% Methanol, 200 bis 400mM KCl). Die Flußrate beträgt ca. 20ml/h, die Größe der Fraktionen 2ml. Der Proteingehalt wird durch E_{280} bestimmt.

20. DEAE-Chromatographie von Aminoxid-Extrakten

Der Extrakt wird auf 100mM KCl, 20% Methanol und 25mM Aminoxid eingestellt. 60mg Protein werden auf eine mit dem gleichen Puffer äquilibrierte DEAE-Sepharose-CL 6B Säule (2,5x9cm) aufgetragen. Die Säule wird mit 100ml Startpuffer gewaschen und die ATP-Synthetase durch einen linearen KCl-Gradienten (100-300mM, 2x160ml) mit einer Flußrate von ca. 60ml/h eluiert. Der Proteingehalt der Fraktionen wird nach Lowry bestimmt (4.9.2) bestimmt. Fraktionen mit einer spezifischen ATPase-Aktivität > 12 E/mg werden vereinigt und 12-15 h bei 220000xg zentrifugiert. Das Sediment wird in 1ml Puffer L (100mM KCl, 25mM AO, 20% Methanol) aufgenommen.

21. Ouchterlony-Doppeldiffusionstest

Von den Mu-lysogenen Mutanten werden ATPase-freie Membranvesikel hergestellt. Die nach den Ultrazentrifugationen anfallenden Überstände werden vereinigt und das Protein durch Ammoniumsulfat (66% gesättigt bei $0^{o}C$) ausgefällt. Nach Abzentrifugation des Niederschlags wird das Sediment möglichst konzentriert in Puffer F aufgenommen und 10µl in den Test eingesetzt (Platten f.Test von Hyland, München). Im mittleren Loch werden 10µl ATPase-Antikörper

aufgetragen. Die Platte wird in einer feuchten Kammer 18^h inkubiert. Nach Waschen mit 3mM SDS ($3x1^h$) wird der Agar mit Coomassie Blau gefärbt (s.4.22.1).

22. Gelelektrophorese

22.1 Diskontinuierliche Elektrophorese im Porengradientengel

Die Elektrophorese wird in Plattengelen (1,5x140x160mm) ausgeführt. In die vordere Kammer eines Gradientenmischgefäßes werden 13ml Puffer P (10% Polyacrylamid, 0,7% Diallylweinsäurediamid) gegeben, in die hintere 13ml Puffer P (30% Polyacrylamid, 2% Diallylweinsäurediamid). Durch Unterschichten wird ein linearer Polyacrylamidgradient (10%-30%) gebildet. Nach Erstarren des Trenngeles werden 5ml Sammelgel in Puffer Q (5% Polyacrylamid, 0,15% Bis-Methylenacrylamid, 0,3% Ammoniumpersulfat, 0,1% TMED) aufpolymerisiert. Als Reservoirpuffer dient Puffer R. Die Proben werden auf 1mg Protein/ml in Puffer Q (5% Glycerin,1% Mercaptoäthanol, 1% SDS, 0,002% Bromphenolblau) verdünnt und 10 min bei 37^oC inkubiert. Die Probe wird durch Unterschichten aufgetragen. Bis zum Eintritt der Probe ins Trenngel wird eine Spannung von 60 V angelegt, danach eine Spannung von 100 V. Nach 12^h-15^h wird die Elektrophorese abgebrochen. Das Gel wird nacheinander je 2^h bei Raumtemperatur im 10fachen Volumen folgender Lösungen gebadet: 1. 10% TCA 2. 10% Isopropanol, 10% Essigsäure 3. 2,5% Coomassie Blau R 250, 40% Methanol, 10% Essigsäure . Danach wird das Gel bis zur völligen Entfärbung in 10% Isopropanol, 10% Essigsäure gebadet.

22.2 Kontinuierliche SDS-Gelelektrophorese

Die Elektrophorese wird in Plattengelen (s.o.) ausgeführt. Die Zusammensetzung des Gels ist 15% Polyacrylamid, 1,25% Diallylweinsäurediamid, 0,06% Ammoniumpersulfat, 0,1% TMED, 48% Harnstoff (8M), 0,5% SDS (alle Prozentangaben in w/v) und 100mM Tris-Acetat pH8.

Der Elektrodenpuffer besteht aus 100mM Tris-Acetat pH8, 0,5% SDS. Die Proben werden in 25mM Tris-Acetat pH8, 48% Harnstoff, 2% SDS, 1% Mercaptoäthanol, 5% Glycerin verdünnt. Das Auftragsvolumen beträgt maximal 20µl.

23. Fluorographie (Bonner & Laskey, 1974)

Das Gel wird nach dem Entfärben fotografiert und dann nacheinander in folgenden Lösungen gebadet: 1^h in 10fach Vol. Dimethylsulfoxid, 1^h in 20fach Dimethylsulfoxid, 2^h in 4fach Vol. Dimethylsulfoxid, 22%(w/v) 2,5-Diphenyloxazol, sowie 1^h in H_2O. Nach Trocknen des Gels wird ein Kodak X-Omat R-Film aufgelegt. Der Film wird belichtet und dann entwickelt (Ilford Hypam Entwickler).
In den angeführten Versuchen werden ca. 1000-2000 cpm ^{14}C-markiertes Material aufs Gel aufgetragen; die Belichtungszeit beträgt dann ca. 40^h-60^h.

24. Markierung des DCCD-bindenden Proteins mit ^{14}C-DCCD und Extraktion des Proteins mit Chloroform/Methanol (Fillingame,1975)

Membranvesikel werden in Puffer (50mM Tris-Cl pH8, 10mM $MgCl_2$, 200mM KCl, 6mM PAB) aufgenommen und mit 5nMol (^{14}C)-DCCD (5 Curie/Mol) / mg Protein 20^h auf Eis inkubiert. Die Membranvesikel werden abzentrifugiert und in 20ml Chloroform/Methanol (2:1)/g-Naßgewicht suspendiert. Nach 2^h Rühren bei 0^oC wird das unlösliche Material 10 min bei 20000xg abzentrifugiert. Der Überstand wird mit 0,2ml H_2O versetzt. Nach gründlicher Durchmischung werden die Phasen durch Zentrifugation getrennt; die obere Phase wird verworfen und die untere Phase 2mal mit Chloroform/Methanol/H_2O (3:47:48) gewaschen. Zur unteren Phase wird danach ein Vol. Chloroform gegeben. Eine eventuell auftretende Trübung wird durch Zugabe von ein paar Tropfen Methanol beseitigt. Die Lösung wird am Rotationsverdampfer bis zur Trockenheit eingeengt und das Material in etwas Chloroform/Methanol (2:1) aufgenommen. Nach Zugabe von 5fach Vol. Diäthyläther wird der Ansatz 1^h bei 0^oC inkubiert und der Nieder-

schlag 10 min bei 20000xg abzentrifugiert. Das Sediment wird in Chloroform/Methanol (2:1) aufgenommen und die Ätherfällung wiederholt. Für die Gelelektrophorese wird das Sediment im Probenpuffer aufgenommen.

25. Isolierung von Phosphatidyläthanolamin und -cholin

10g Asolectin werden 40^h bei Raumtemperatur in 200ml Aceton (+ 1mg N,N-Phenyl-p-phenylendiamin) gerührt und das Aceton über einen Papierfilter abgetrennt. Der Rückstand wird in 50ml Diäthyläther (+ 50µg N,N-Phenyl-p-phenylendiamin) aufgenommen und die ätherunlöslichen Bestandteile 5 min bei 10000xg abzentrifugiert. Der Überstand wird im Vakuum eingeengt,in 30ml Chloroform aufgenommen und auf eine mit Chloroform äquilibrierte Kieselgel-Säule (3x100cm) aufgetragen. Die Säule wird mit je 1 l Chloroform, Chloroform/Methanol (9:1), (7:1), (5:1), (1:1), sowie Methanol gewaschen. Die Chloroform/Methanol (7:1) und die Methanol Fraktion werden im Vakuum eingeengt und bei einer Konzentration von 200mg/ml in Benzol aufgenommen. Je 2µl der konzentrierten Proben werden einer Dünnschicht-Chromatographie auf Kieselgel mit einem Chloroform/Methanol/H_2O (70:30:4) Laufmittelgemisch unterworfen. Parallel werden Standardlösungen von PE und PC aufgetragen. Nach Beendigung der Chromatographie wird die Platte getrocknet, mit 50% H_2SO_4 besprüht und die Platte 30 min bei 120^oC inkubiert. Mehr als 95% des aufgetragenen Materials der Chloroform/Methanol bzw. Methanol Fraktion läuft in einem Fleck parallel zum PE- bzw. PC-Standard.

Literaturverzeichnis

Abrams,A. , Smith,J.B. (1974) Enzymes 3rd Ed. Vol.X, 271-275

Ames,B.N. , Tubin,D.T. (1960) J.Biol.Chem. 235 , 769-773

Altendorf,K. , Harold,F.M. , Simoni,R.D. (1974) J.Biol.Chem. 249 , 4587-4593

Altendorf,K. , Zitzmann,W. (1975) FEBS-Lett. 59 , 268-272

Altendorf,K. (1977) FEBS-Lett. 73 , 271-275

Bonner,W.M. , Laskey,R.A. (1974) Eur.J.Biochem. 46 , 83-88

Boonstra,J. , Gutnick,D.L. , Kaback,H.R. (1975) J.Bact. 124 , 1248-1255

Bragg,P.D. , Hou,C. (1972) FEBS-Lett. 28 , 309-312

Butlin,J.D. , Cox,G.B. , Gibson,F. (1971) Biochem.J. 124-, 75-81

Cox,G.B. , Gibson,F. (1974) Biochim.Biophys.Acta 346 , 1-25

Cox,G.B. , Downie,J.A. , Fayle,D.R.H. , Gibson,F. , Radik,J. (1978) J.Bact. 133 , 287-292

Criddle,R.S. , Parker,L. , Shieh,P. (1977) Proc.Nat.Acad.Sci. 74 , 4306-4310

Dell'Antone,P. , Colonna,R. , Azzone,G.F. (1972) Eur.J.Biochem. 24 , 553-565

Feinstein,D.L. , Fisher,R.J. (1977) Biochem.J. 167 , 497-499

Fillingame,R.H. (1975) J.Bact. 124 , 870-883

Friedl,P. , Schmid,B. , Schairer,H.U. (1977) Eur.J.Biochem. 73 , 461-468

Futai,M. (1977) Biochem.Biophys.Res.Commun. 79 , 1231-1237

Hare,J.F. (1975) Biochem.Biophys.Res.Commun. 66 , 1329-1337

Harold,F.M. (1972) Bact.Rev. 36 , 172-230

Jagendorf,A.T. , Uribe,E. (1966) Proc.Nat.Acad.Sci. 55 170-177

Kagawa,Y. , Racke. ,E. (1971) J.Biol.Chem. 246 , 5477-5487

Kagawa,Y. (1972) Biochim.Biophys.Acta 265 , 287-338

Kagawa,Y. , Kandrach,A. , Racker,E. (1973) J.Biol.Chem. 248 , 676-684

Kagawa,Y. , Sone,N. , Yoshida,M. , Hirata,H. (1976) J.Biochem. 80 , 141-151

Larson,R.J. , Smith,J.B. (1977) Biochemistry 16 , 4266-4270

Lennox,E.S. (1955) Virology 1 , 190-206
Lowry,O.H. , Rosebrough,N.J. , Farr,A.L. , Randall,R.J. (1951) J.Biol.Chem. 193 , 265-275
Maloney,P.C. , Kashket,E.R. , Wilson,T.H. (1974) Proc.Nat.Acad.Sci. 71 , 3896-3900
MacGregor,C.H. (1975) J.Bact. 121 , 1102-1110
Mitchell,P. (1967) Fed.Proc. 26 , 1370-1379
Nelson,N. , Kanner,B.I. , Gutnick,D.L. (1974) Proc.Nat.Acad.Sci. 71 , 2720-2724
Nelson,N. (1976) Biochim.Biophys.Acta 456 , 314-318
Nelson,N. , Eytan,E. , Notsani,B. , Sigrist,H. , Sigrist-Nelson,K. , Gitler,C. (1977) Proc.Nat.Acad.Sci. 74 , 2375-2378
Nieuwenhuis,F.J. , Kanner,B.I. , Gutnick,D.L. , Postma,P.W. , van Dam,K. (1973) Biochim.Biophys.Acta 325 , 62-71
Nieuwenhuis,F.J. , Bakkenist,A.J. (1977) Biochim.Biophys.Acta 459 , 596-604
Osborn,M.J. , Gander,J.E. , Parisi,E. , Carson,J. (1972) J.Biol.Chem. 247 , 3962-3972
Penefsky,H.S. (1974) Enzymes 3rd Vol.X 375-395
Postma,P.W. , Nieuwenhuis,F.J. , van Dam,K. (1975) in "Electron Transfer Chains and Oxidative Phosphorylation" (Quagliarello et al,eds) 217-222 , Elsevier
Racker,E. , Eytan,E. (1973) Biochem.Biophys.Res.Commun. 55 , 174-178
Rosen,B.P. (1973) J.Bact. 116 , 1124-1129
Rosen,B.P. , Brey,R.N. , Hasan,S.M. (1978) J.Bact. 134 , 1030-1038
Schairer,H.U. , Haddock,B.A. (1972) Biochem.Biophys.Res.Commun. 48 544-551
Schairer,H.U. , Friedl,P. , Schmid,B. , Vogel,G. (1976) Eur.J.Biochem. 66 , 257-256
Schuldiner,S. , Rottenberg,H. , Avron,M. (1971) Eur.J.Biochem. 21 404-410
Sebald,W. (1977) Biochim.Biophys.Acta 463 , 1-27
Simoni,R.D. , Shandell,A. (1975) J.Biol.Chem. 250 , 9421-9427

Singh,A.P. , Bragg,P.D. (1977) Biochim.Biophys.Acta 464 , 562-570
Slater,E.C. in "Oxidative Phosphorylation" (Florkin,M. , Stotz,E.H. ,eds) 327-396 , Elsevier

Smith,J.B. , Sternweis,P.C. (1975) Biochem.Biophys.Res.Commun. 62 , 764-771

Smith,J.B. , Sternweis,P.C. (1977) Biochemistry 16 , 306-311

Sone,N. , Yoshida,M. , Hirata,H. , Kagawa,Y. (1975) J.Biol.Chem. 250 , 7917-7923

Sone,N. , Yoshida,M. , Hirata,H. , Kagawa,Y. (1978) Proc.Nat.Acad.Sci 75 , 4219-4223

Sternweis,P.C. , Smith,J.B.(1977) Biochemistry 16 , 4020-4025

Sternweis,P.C. (1978) J.Biol.Chem. 253 , 3123-3128

Tzagoloff,A. , Penefsky,H.S. (1971) Meth. in Enzymologie Vol.23 , 219-230

Vogel,H.J. , Bonner,D.M. (1956) J.Biol.Chem. 218 , 97-106

Vogel,G. , Steinhart,R. (1976) Biochemistry 15 , 208-216

Yoshida,M. , Sone,N. , Hirata,H. , Kagawa,Y. (1975) J.Biol.Chem. 250 , 7910-7916

Lebenslauf

Am 28. März 1951 wurde ich als Sohn des Finanzbeamten Ernst Friedl und seiner Ehefrau Gerda, geb. Hintzen, in Köln geboren. Dort besuchte ich von 1957 bis 1961 die Volksschule und anschließend das neusprachliche Schiller-Gymnasium. Die Reifeprüfung legte ich 1969 ab.
Von 1969 bis 1973 studierte ich Biologie an der Universität zu Köln. Nach der Diplomprüfung im November 1973 fertigte ich meine Diplomarbeit 1974 am Max-Planck-Institut für Biologie in Tübingen, Abtlg. Overath, an. Sie entstand unter Anleitung von Herrn Dr. Schairer und befaßte sich mit dem oxidativen Energiestoffwechsel von E. coli. Ebenfalls unter Anleitung von Herrn Dr. Schairer entstand die vorliegende Arbeit in der Zeit von Juni 1975 bis August 1977 am Max-Planck-Institut für Biologie in Tübingen, Abtlg. Overath, und von Dezember 1977 bis Juli 1978 bei der Gesellschaft für Biotechnologische Forschung mbH. in Braunschweig, Abtlg. Stoffwechselregulation.
Am 1. August 1977 heiratete ich Fräulein Christina Sigel.

Meine akademischen Lehrer waren:

M. Baudler, L. Bergmann, V. Braun, Chr. von Campenhausen, W. Davies, D. Doerfler, R. Ehring, K. Eichmann, B. Gutte, U. Hauser, D. Hummel, L. Jaenicke, H. Kneser, J. Lengeler, B. Müller-Hill, P. Overath, K. Rajewski, H.U. Schairer, P. Starlinger, W. Vielmetter, E. Vogel, H. Zähner.